

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de las  $\beta$ -glucosidasas del complejo celulítico de *Talaromyces*  
*amestolkiae*:  
caracterización y aplicaciones biotecnológicas**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**


**PRESENTADA POR**

**Jesús Gil Muñoz**

**Directoras**

**María Jesús Martínez Hernández  
Laura Isabel de Eugenio Martínez**

**Madrid, 2015**



# Estudio de las $\beta$ -glucosidasas del complejo celulolítico de *Talaromyces amestolkiae*: Caracterización y aplicaciones biotecnológicas

Jesús Gil Muñoz



# **Estudio de las $\beta$ -glucosidasas del complejo celulolítico de *Talaromyces amestolkiae*: Caracterización y aplicaciones biotecnológicas.**

Tesis doctoral para optar al grado de  
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

presentada por:

**Jesús Gil Muñoz**



**DIRECTORES:**

Dra. M<sup>a</sup> Jesús Martínez Hernández, Dra. Laura Isabel de Eugenio Martínez  
y Dr. Jorge Barriuso Maicas

Centro de Investigaciones Biológicas  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**TUTORA:**

Dra. M<sup>a</sup> Isabel de la Mata Riesco  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid

**Madrid, 2015**





**LA DRA. M<sup>a</sup> JESÚS MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, INVESTIGADORA CIENTÍFICA DEL CSIC Y LOS DRES. LAURA ISABEL DE EUGENIO MARTÍNEZ Y JORGE BARRIUSO MAICAS, INVESTIGADORES CONTRATADOS DEL CSIC,**

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo “Estudio de las  $\beta$ -glucosidasas del complejo celulolítico de *Talaromyces amestolkiae*: Caracterización y aplicaciones biotecnológicas.”, constituye la memoria que presenta el Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Cádiz, Jesús Gil Muñoz para optar al grado de Doctor y ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Biología Medioambiental del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid.

Y para que conste, firman el presente certificado en Madrid, a 22 de Abril de 2015.

Dra. M<sup>a</sup> Jesús Martínez

Dra. Laura I. de Eugenio

Dr. Jorge Barriuso Maicas



“

La madre naturaleza es una asesina en serie. Nadie la supera. Y es la más creativa. Pero como todo asesino en serie siente el irrefrenable deseo de que la atrapen. ¿De qué sirven esos fantásticos crímenes si nadie se lleva el mérito? De modo que va dejando miguitas. Lo más difícil, y para eso uno estudia durante años, es reconocerlas e interpretarlas. Y a veces lo que creías que era el aspecto más brutal y activo del virus, resulta que es su talón de Aquiles. Y a ella le encanta disfrazar sus flaquezas de fortalezas. Es una canalla.

”

Elyes Gabel (como Andrew FassBach)  
Guerra Mundial Z





## AGRADECIMIENTOS

Decía el alquimista de Paulo Coelho que “cuando una persona desea realmente algo, el universo entero conspira para que pueda realizar su sueño”. Yo no tengo claro que esto ocurra siempre, ni siquiera a todas las personas. Tampoco sé muy bien dónde está el límite. Más bien creo que es el azar el que hace que las cosas cambien en un momento y dirección determinados, o a lo mejor las propias personas quienes, con su esfuerzo, mueven y provocan las situaciones. O quizá sea la suma de las dos: unas veces tirará más el azar y otras, la voluntad. Sea lo que sea, aquí está mi Tesis Doctoral, ¿quién me lo iba a decir a mí?... Sancho Panza, gobernador de la ínsula Barataria. Dicho esto, no querría dejar pasar la oportunidad que se me brinda aquí para agradecer a la gente que, con su voluntad y empeño, influyó para que el universo conspirara a mi favor.

Un agradecimiento capital a la financiación recibida a través de sendos contratos adscritos al proyecto “Biocatalizadores de alta eficiencia para la segunda generación de bioetanol” (BIOCAT2ndOL), en colaboración con la empresa Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías (ABNT), y al proyecto bilateral España-Argentina “Estudio y caracterización de enzimas fúngicas para el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica” (Ref. PRI-PIBAR-2011-1402), financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) del Gobierno de España.

Gracias a la Dra. María Jesús Martínez, una persona que si bien no es ubicua, al menos es pentadimensional. Me dio la oportunidad de vivir esta inolvidable etapa. Gracias por confiar en mí cuando los tiempos eran más que difíciles. Gracias a la tan agradable y dicharachera Dra. Alicia Prieto, de quien admiro su absoluta disponibilidad y su desinteresada ayuda. Gracias a Mari Jose Tobajas, que se convirtió en mi protectora, no había quien me soplara con ella delante.

Gracias a la Dra. Susana Camarero, el alfa de esta historia, con ella comenzó todo. Al Dr. Javier Ruíz, por nuestras incontables charlas y su constante apoyo, sobre todo en tiempos de crisis. A la Dra. Marta Pérez, por su saber estar y sus ánimos. A los tres, gracias por el cariño mostrado. Al Dr. Ángel T. Martínez, por su entereza y seriedad.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, con los que he compartido codo con codo esta experiencia. A Bea Casas y Miguel Jurado, mis primeros mentores en el mundo de los hongos y las enzimas. A Mariu, mi gran cicerone, quien me hizo sentir como en casa desde el primer día. A Davinia, el día a día sabía mejor con ella a mis espaldas. A Isa Pardo, por dar ese toquecito andaluz tan vital para mi ser. A Úrsula, por su armonía y sus capoeiras. Al incomprendido Víctor. A Aitor, por su combinación de honestidad y ese pesimismo tan cómico. A Vero, por verter siempre dulzura en un ambiente tan enrarecido. A la adorable Lola, por su continuo apoyo. A Elena, por esa pasión desorbitada trabajando. Gracias a Laura de Eugenio, mi compañera y mi guía la mayor parte de este viaje, por sus consejos y

orientación. A Belendi, por sus locuras tan espontáneas como necesarias. A Isa Vicente, por aportar y transmitir tanto entusiasmo. A Raúl Lloret, mi primer colega, me lo pasé realmente bien con él. Gracias a Jorge Barriuso, su talento como científico únicamente es comparable a su generosidad como amigo, gracias por tu incondicionalidad, aliento y estímulo. Gracias a Manolito (cállate ya), por cautivarme desde los pies a la cabeza con su derroche de ingenio, con su muro de autocontrol y con sus fandangos. A su inseparable Emi, por sus “agorerismos”. Gracias a los dos por dejarme entrar en ese tan exclusivo comando Foster. A Juan Carro, por ser tan cachondo como inteligente bajo ese manto de rizos. A los ICPeros Javi y Bernardo, por su constante buen rollo. A Cristina Coscolín, por mostrar sus dos cojones y su ternura a la vez. A Felipe, el almendritas, por tantas risas y momentos compartidos. Al galán Iván, por su generosidad y su inestimable camaradería. A Sergio, para quien todavía estoy buscando una beca. A Bea Balcells, por su sinceridad y por compartir conmigo invencibles tardes de pádel. Al figura David, por liarla tanto y ser tan majete (cuánta razón tiene tu abuela). A Ana Serrano, por su integridad y su franqueza. A Juan Méndez, con quien conecté rápidamente por tantos gustos compartidos. A la tan ocurrente y original Lorea. A María Molina, por su encanto medio andaluz. A Rosa Fishes, por su honradez y simpatía. Y a Meme, la última joya de la corona.

Me llevo la satisfacción de que la mayoría sabe ya situar Barbate en el mapa y los que fueron a conocerlo se volvieron con un gran sabor de boca.

Gracias a los que dejaron tan lejos sus países para venir a aprender a nuestro grupo. Al escocés Craig. A los que vinieron desde el otro lado del charco, como la brasileña Elda, los argentinos Leandro (DEP), Mario y Carlos y las colombianas Xiomara y Ledys. A los de la lejana Asia, como el gran Yuta Miki, del Japón, y Xueyu, de China. Y a Dalel, desde la africana Túnez.

Gracias a los compañeros de otros laboratorios, que me ayudaron o que se interesaron por mí o simplemente me saludaron por los pasillos o en el ascensor (o no), a los de la tercera planta, a los Peñalva, a Fran Fernández por su asesoramiento con el fermentador. Gracias a todos los servicios del CIB: desde Secugen, las mujeres de compras, los del almacén, hasta Vivi y Paco de proteómica, Mónica de fotografía, Leo de cromatografía de gases, Rosa de esterilización, Olvido y Milagros de la biblioteca, las limpiadoras Isi y Gloria, pasando por Sara y Blasa de limpieza de material, los del servicio técnico y los guardias de seguridad. Mención especial al pseudobarbateño Miguel Soto y a Manuel Molina. En definitiva, gracias al CIB al completo, mi casa.

Gracias a mi familia porque ellos han sido, son y serán absolutamente TODO para mí. Sin ellos, nada sería posible. Ellos son los faros que iluminan mi camino. Son mis ídolos y, a la vez, mis fans. Esto es especialmente para ellos. Gracias a mi padre y a mi madre, por ser el pilar fundamental de lo que soy. Gracias a mi hermano, a Estherilla y a Amaia, por su feroz e incondicional apoyo. Gracias a mi

hermanito Kike, por nuestra mutua devoción. Gracias a Rosita, con quien estoy construyendo un mundo sin horizonte. Tenerte a mi lado me hace sentir inmortal. Gracias a mi almohadita, mi confidente cada noche de mi vida. Gracias a mi Tata, por todo lo que significa para nosotros. Gracias a mi otra familia: Rosa madre, Ernesto, Susana, Juan Ramón, Chari, Antonio y Juan Carlos. Gracias a Yoli, por solucionarme media vida (o más) al llegar a Madrid. Gracias a Jorge, por tantos buenos momentos vividos en cada visita.

Gracias a mis amigos de Barbate: Andry, Juan Ignacio, Coca, Goma, Paco, Pelo..., Santos, Vero, Paco, Celia, Inma, Luís, Fátima... Gracias a mis otros hermanos, Montero y Sánchez, con quien viví algunos de los mejores ratos de mi vida. Gracias también a mis compañeros de la carrera.

Gracias a Madrid, la capital del Reino, una ciudad casi diseñada para mí. Y eso es mucho para alguien que nació y creció sintiendo el mar.

Gracias al CIB Athletic, con el que hice realidad lo que siempre soñé para el FC Particular cuando era chico. Gracias a todos los que han vestido su camiseta: Pau Alonso, Álvaro Amo, Edu Amo, Mikel Aristorena, Javi Barrero, Jorge Barriuso (otra vez), Rafa Catalá, Cristian Carrasco, Fran Carrillo, Jose Carrillo, César Carroza, Diego Carroza, Alfonso Guajardo, Rodri Guzmán, Raúl Huertas, Javi F. Juárez, David López, Jaime Louro, Hugo Muñoz, Philippe Nicolas, Carlos Perea, Miguel Ponce, Erney Ramírez, Andrés Valderrama y Álvaro Wandosell.

Gracias a mi Real Madrid, al que tuve el gran privilegio de ver ganar absolutamente todo desde muy cerca y, por supuesto, lo celebré por todo lo alto. Dije que no me iría de Madrid sin celebrar la Décima, pues ya me puedo ir tranquilo, pero si cae la Undécima antes, mejor.

Gracias a mis compañeros de “El fútbol es injusto” y “Toda una amalgama” por dejarme entrar en sus fabulosos equipos de redacción y hacerme más llevaderos estos últimos meses.

Gracias a mi tan admirado Napoleón Bonaparte, a Harry Quebert, a Tyrion Lannister, al Doctor Mateo, a Dexter Morgan, a Arno Dorian y a Walter White.

Gracias a todas aquellas personas anónimas que se cruzaron en mi camino y que de una u otra forma pusieron su granito de arena para que hoy sea quien soy. Gracias incluso a los que me hicieron daño, pues sus reveses me hicieron más fuerte.

Y no quiero acabar sin disculparme si mis palabras no han sido las que esperábais, pero es que sois muchos y mi frenesí verbal tiene un límite. Perdón también si alguna de las personas que ha pasado por mi vida estos últimos años no se encuentre en estas líneas. Simplemente se tratará de un despiste.

Sin más, gracias a todos por tanto.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	iii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA: LA PARED CELULAR VEGETAL....	3
1.1.1. Componentes de la lignocelulosa.....	4
1.1.1.1. Celulosa.....	4
1.1.1.2. Hemicelulosa.....	5
1.1.1.3. Lignina.....	6
1.1.2. Degradación de la lignocelulosa en la naturaleza.....	7
1.2. GLICOSIL HIDROLASAS.....	8
1.2.1. Nomenclatura y clasificación.....	8
1.2.2. Mecanismos de hidrólisis del enlace glicosídico.....	9
1.3. HIDRÓLISIS DE LA CELULOSA.....	10
1.3.1. Enzimas del complejo celulolítico.....	11
1.3.1.1. Endoglucanasas.....	11
1.3.1.2. Exoglucanasas.....	11
1.3.1.3. $\beta$ -glucosidasas.....	12
1.3.2. Estructura molecular de las celulasas.....	12
1.3.3. Sinergia entre celulasas.....	14
1.4. CELULASAS FÚNGICAS.....	14
1.4.1. <i>T. reesei</i> como modelo de microorganismo productor de celulasas.....	15
1.4.2. <i>Penicillium</i> productores de celulasas.....	16
1.4.3. Otros hongos.....	17
1.5. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS CELULASAS.....	18
1.5.1. Bioetanol de segunda generación.....	18
1.5.1.1. Pretratamiento.....	19
1.5.1.2. Hidrólisis enzimática (sacarificación).....	21
1.5.1.3. Fermentación.....	22
1.5.2. Otras aplicaciones.....	24
1.5.3. Aplicaciones específicas de BGL.....	25
1.5.3.1. Hidrólisis de glicósidos.....	25
1.5.3.2. Actividad sintética: transglicosilación.....	26
1.5.3.2.1. Alquilglicósidos.....	27
1.5.3.2.2. Oligosacáridos.....	27
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1. CEPAS DE MICROORGANISMOS.....	35
3.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	35
3.2.1. PDA.....	35
3.2.2. CSS.....	35
3.2.3. Mandels.....	36
3.2.4. Agar CYA.....	36
3.2.5. Agar YES.....	37
3.2.6. MEA.....	37
3.2.7. LB.....	38
3.2.8. SOB.....	38
3.3. MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS.....	38
3.3.1. Mantenimiento de hongos.....	38
3.3.2. Cultivo de hongos.....	39
3.3.3. Mantenimiento de bacterias.....	39
3.3.4. Cultivo de bacterias.....	39
3.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS CEPAS FÚNGICAS.....	39
3.4.1. Análisis macroscópico.....	39
3.4.2. Análisis microscópico.....	40
3.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	40
3.5.1. Cuantificación de proteínas.....	40
3.5.2. Cuantificación de sustancias reductoras.....	40
3.5.3. Cuantificación de glucosa.....	41
3.5.4. Determinación del pH.....	41
3.5.5. Valoraciones enzimáticas de celulasas.....	41
3.5.5.1. Actividad celulasa global (avicelasa) .....	42
3.5.5.2. Actividad endoglucanasa.....	42
3.5.5.3. Actividad $\beta$ -glucosidasa.....	43
3.6. PRODUCCIÓN DE CELULASAS.....	43
3.7. TÉCNICAS DE ULTRAFILTRACIÓN.....	44
3.7.1. Ultrafiltración tangencial.....	44
3.7.2. Ultrafiltración bajo presión.....	44
3.7.3. Ultrafiltración por centrifugación.....	44
3.8. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	44
3.8.1. Purificación de las BGL de <i>T. amestolkiae</i> .....	44
3.8.1.1. Intercambio aniónico.....	45
3.8.1.2. Exclusión molecular.....	45
3.8.2. Cromatografía en capa fina.....	46
3.8.3. Cromatografía de gases / espectrometría de masas.....	46

3.9. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	46
3.9.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.....	46
3.9.2. Determinación de la masa molecular de las proteínas.....	48
3.9.3. Tinción de glicoproteínas.....	49
3.9.4. Desglicosilación.....	49
3.9.4.1. Endo-H.....	49
3.9.4.2. PNGasa F.....	50
3.9.4.3. O-glicosidasa.....	50
3.9.5. Isoelectroenfoque.....	50
3.9.6. Huella peptídica.....	51
3.9.7. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de las BGL..	52
3.9.7.1. pH óptimo.....	52
3.9.7.2. Estabilidad frente a pH.....	53
3.9.7.3. Temperatura óptima.....	53
3.9.7.4. Estabilidad frente a temperatura.....	53
3.9.8. Estudios de especificidad.....	53
3.9.8.1 Constantes cinéticas y estudios de inhibición.....	54
3.9.9. Efecto de varios compuestos sobre la actividad BGL.....	54
3.9.10. Reacciones de transglicosilación.....	54
3.9.10.1. Síntesis de alquilglicósidos.....	54
3.9.10.2. Síntesis de celooligosacáridos.....	55
3.9.11. Estudio del secretoma de <i>T. amestolkiae</i> .....	55
3.9.11.1. Electroforesis bidimensional.....	55
3.9.11.2. Análisis masivo de péptidos por nanoLC-MS/MS.....	57
3.10. TÉCNICAS MOLECULARES.....	58
3.10.1. Extracción de ADN.....	58
3.10.2. Cuantificación y calidad del ADN.....	59
3.10.2.1. Espectroscopía ultravioleta-visible.....	59
3.10.2.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	59
3.10.3. Amplificación de ADN.....	60
3.10.3.1. Identificación molecular de <i>T. amestolkiae</i> .....	60
3.10.3.2. Amplificación de <i>bgl-1</i> , <i>bgl-2</i> y <i>bgl-3</i> de <i>T. amestolkiae</i> .....	61
3.10.4. Ligación de fragmentos de ADN.....	62
3.10.5. Preparación de células quimiocompetentes y transformación de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	62
3.10.6. Secuenciación de ADN.....	63
3.10.7. Análisis de secuencias y modelado molecular.....	63
3.10.8. Análisis filogenéticos.....	64
3.11. SACARIFICACIÓN DE <i>SLURRY</i> ÁCIDO DE PAJA DE TRIGO CON EL CRUDO ENZIMÁTICO DE <i>T. amestolkiae</i> .....	66



<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>69</b>
4.1. IDENTIFICACIÓN DEL HONGO DE ESTUDIO	71
4.1.1. Identificación molecular	71
4.1.2. Identificación morfológica	73
4.1.3. Estudio filogenético de las especies fúngicas estudiadas	75
4.2 PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE <i>T. amestolkiae</i>	78
4.2.1. Optimización de la producción	78
4.2.2. Purificación de las BGL	86
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS BGL DE <i>T. amestolkiae</i>	90
4.3.1. Masa molecular y punto isoelectrico	90
4.3.2. Glicosilación	91
4.3.3. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad	92
4.3.4. Especificidad de sustrato	96
4.3.5. Estudios cinéticos	97
4.3.6. Efecto de varios compuestos sobre la actividad	98
4.3.7. Inhibición por glucosa y $\delta$ -gluconolactona	100
4.3.8. Reacciones de transglicosilación	101
4.3.8.1. Síntesis de alquilglicósidos	102
4.3.8.2. Síntesis de celooligosacáridos	105
4.4. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS BGL DE <i>T. amestolkiae</i>	108
4.4.1. Identificación de péptidos internos	108
4.4.2. Determinación y análisis de las secuencias nucleotídicas	110
4.4.2.1. BGL-1	110
4.4.2.2. BGL-2	112
4.4.2.3. BGL-3	114
4.4.3. Clasificación y filogenia	115
4.4.4. Dominios conservados y modelado por homología	119
4.4.4.1. BGL-1	119
4.4.4.2. BGL-2 y BGL-3	119
4.5. APLICACIONES Y ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL CRUDO	
ENZIMÁTICO DE <i>T. amestolkiae</i>	124
4.5.1. Sacarificación de <i>slurry</i> ácido de paja de trigo	124
4.5.2. Análisis proteómico del secretoma de <i>T. amestolkiae</i>	128
4.5.2.1. Gel bidimensional	128
4.5.2.2. Análisis masivo de péptidos	131
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>137</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>141</b>

## RESUMEN

La celulosa es la fuente de energía más abundante y renovable que hay en la Tierra. Su transformación en glucosa se considera la etapa más importante en la producción de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica, pues condiciona el rendimiento del resto del proceso. Para esta transformación es necesaria la acción sinérgica de tres tipos de enzimas que hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 de la celulosa: (i) las endoglucanasas (EG), que actúan al azar sobre enlaces internos, (ii) las celobiohidrolasas (CBH), que operan progresivamente por los extremos reductores y no reductores de la cadena, y (iii) las  $\beta$ -glucosidasas (BGL), que hidrolizan celobiosa y los celooligosacáridos más pequeños hasta glucosa.

Los hongos filamentosos constituyen la principal fuente de celulasas, siendo los crudos del género *Trichoderma* los más estudiados y comercializados históricamente. Sin embargo, estos hongos secretan niveles insuficientes de BGL para una conversión efectiva de la celulosa, por lo que con frecuencia requieren ser suplementados con preparaciones ricas en esta enzima procedentes de otros hongos.

Recientemente, se han descrito cepas de *Penicillium* (o su forma perfecta, *Talaromyces*) con gran capacidad para secretar altos niveles de BGL al medio extracelular. Además de su papel en la hidrólisis de la celulosa en las aplicaciones que así lo requieren, esta enzima puede también emplearse para sintetizar compuestos de interés industrial, tales como alquilglicósidos o celooligosacáridos, mediante reacciones de transglicosilación.

En este trabajo se ha estudiado una nueva cepa fúngica productora de celulasas. Se ha identificado como *Talaromyces amestolkiae*, en base a sus características morfológicas y la secuencia de varios marcadores genéticos. Se han purificado a homogeneidad electroforética tres BGL (BGL-1, BGL-2 y BGL-3) secretadas por el hongo y se han caracterizado bioquímicamente. BGL-1 y BGL-2 son proteínas monoméricas, mientras que BGL-3 es un dímero funcional. Los valores de actividad máxima de estas enzimas se obtuvieron a pH 4,0 y entre 50-60 °C, siendo estables en un rango de pH de 4-7 y a 50 °C. Las tres mostraron distinto comportamiento en función del sustrato (*p*NPG o celobiosa), ensayándose también el efecto de determinados compuestos químicos e inhibidores en su actividad. Las tres pueden hidrolizar celooligosacáridos de diferente longitud, disminuyendo la eficacia de hidrólisis con el aumento de la polimerización, y no son activas frente a polisacáridos. Además, mostraron actividad de transglicosilación, formando alquilglicósidos y celooligosacáridos de mayor longitud que los usados como sustratos.

Las tres BGL se identificaron mediante huella peptídica, demostrándose que se trataba de enzimas diferentes. Basándose en la alta homología de estas enzimas con otras BGL fúngicas relacionadas filogenéticamente, se diseñaron cebadores específicos que permitieron la secuenciación de los genes que codifican cada una de ellas. El análisis de las secuencias aminoacídicas mostró que BGL-1 es miembro de la familia 1 de las glicosil hidrolasas, mientras que BGL-2 y BGL-3 pertenecen a la familia 3. Teniendo en cuenta que existen pocas BGL fúngicas cristalizadas, se construyeron modelos moleculares de estas últimas en base a las estructuras con las que presentaron mayor identidad.

El crudo enzimático de *T. amestolkiae*, rico en BGL, de forma individual o en combinación con otros cócteles comerciales, se utilizó en experimentos de sacarificación a partir de paja de trigo pretratada por explosión a vapor en presencia de ácido (*slurry* ácido). Los resultados obtenidos indican que el hongo secreta, además de celulasas, otras enzimas complementarias que potencian la liberación de azúcares fermentables.

Con objeto de analizar en profundidad las enzimas producidas por el hongo en presencia de distintas fuentes lignocelulósicas, se analizó su secretoma partir de cultivos utilizando Avicel o *slurry* ácido de paja de trigo como fuente de carbono. En ambas condiciones, las CBH fueron las enzimas más abundantes, seguidas de las BGL. Sin embargo, en el cultivo inducido con *slurry* aumentó la proporción de BGL y otras enzimas distintas a las celulasas. Esto indica que para la degradación de un sustrato complejo es necesaria mayor diversidad enzimática; en este caso son necesarias las enzimas implicadas en degradar tanto la celulosa, como los demás componentes de la pared celular vegetal. Los resultados obtenidos en este trabajo abren nuevas vías para la formulación de cócteles enzimáticos eficaces en el contexto de la degradación de la biomasa lignocelulósica.

## SUMMARY

### *Introduction*

Cellulose is the most abundant biopolymer on Earth and it has a great potential as a renewable biomass and energy source. Biological conversion of cellulosic biomass is a promising green alternative for the production of second-generation (2G) ethanol and other chemicals. First generation (1G) biofuels are directly related to a generally edible biomass so that 2G biofuels appear to end the food-versus-fuel debate.

Chemically, cellulose is a linear  $\beta$ -(1,4)-glucose polymer containing amorphous and crystalline regions depending on their chains order degree. This heterogeneous nature requires the action of several enzymes, acting synergistically, to be fully converted into its building blocks: cellulases can be divided into three major enzymes: i) endoglucanases (EG), acting on amorphous regions, ii) cellobiohydrolases (CBH), preferring crystalline substrates and iii)  $\beta$ -glucosidases (BGL) acting on cellobiose and cello-oligosaccharides. BGLs are especially attractive for two reasons: they are defective in current commercial cocktails and they can also be applied to synthesize oligomers and other complex molecules, such as alkyl-glucosides, by transglycosilation reactions.

Filamentous fungi are the main source of commercial cellulases. In recent years, cellulase systems of *Penicillium* strains (or its perfect state *Talaromyces*) deserve significant attention in the production of cellulases. Specifically, several researchers have pointed out high BGL activity released by *Penicillium* species.

### *Aims*

In this context, the aims of the present Thesis are:

- i) To identify a new cellulolytic fungus, according to their morphological characteristics and using molecular techniques.
- ii) To analyze the ability of the isolated fungus to produce cellulases in the presence of different carbon sources.
- iii) To purify and characterize BGLs secreted by the fungus, from a biochemical and molecular point of view.
- iv) To use these enzymes and/or the fungal enzyme crude in biotechnological applications.

## ***Results and Discussion***

### **Identification of the isolated strain**

In a previous work, a high-cellulase-producing fungal strain was isolated from cereal samples. Sequence analysis of genetic markers such as ITS rDNA, RPB1, and Bt2, as well as morphological studies of this strain revealed its identity with *Talaromyces amestolkiae*.

### **Optimization of cellulases production**

To select a suitable carbon source for cellulase production, *T. amestolkiae* was cultivated in Mandel's medium containing different carbon sources: Avicel, wheat straw, wheat bran, oat bran, and wheat straw pretreated by acidic steam explosion (slurry). Among these, Avicel was found to be the best inducer for cellulase production, leading to avicelase, EG, and BGL activities of 0.4, 3.5, and 1.9 U/mL when cultured in 250 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of medium. Avicel is microcrystalline cellulose, being entirely metabolized by the fungus, whereas the other carbon sources tested contain also hemicellulose and lignin, hindering the access to cellulose.

It should be noted that the production of cellulase by *T. amestolkiae* dramatically increased after the scale-up of fermentations to both higher capacity flasks and a laboratory-scale fermenter.

### **Purification of BGLs**

Three BGLs were purified to homogeneity from the culture supernatant of *T. amestolkiae* grown on Avicel using anion exchange and gel filtration chromatography. The overall enzymes yields were 12.6, 6.1, and 18.1% for BGL-1, BGL-2, and BGL-3, respectively. The purified enzymes appeared as single protein bands on SDS-PAGE with approximate  $M_w$  of 60 kDa for BGL-1 and 100 kDa for BGL-2 and BGL-3.

### **Biochemical characterization of BGLs**

BGL-1 and BGL-2 are monomeric proteins while BGL-3 is a functional dimer. Maximal activity of these enzymes were obtained at pH 4.0 and 50-60° C, being stable over a pH range between 4-7 and at 50 °C. All three enzymes showed different behavior depending on the substrate used (*p*NPG or cellobiose). The effect of certain chemical compounds and inhibitors in BGL activity was also assayed. BGLs of *T. amestolkiae* have the ability to hydrolyze cellooligosaccharides with different length, decreasing their efficiency when the polymerization degree of the substrate increases, and they are not active against polysaccharides. The three enzymes showed transglycosylation activity, being able to transfer glucose to *p*NPG from

aliphatic alcohols as MeOH, EtOH, PrOH, and BuOH to form the corresponding alkyl-glucosides. Furthermore, these enzymes catalyzed the incorporation of additional glucose residues to small celloligosaccharides, detecting cellodecaose as the product with the highest polymerization degree.

### **Identification and sequencing of BGLs**

BGL-1, BGL-2, and BGL-3 of *T. amestolkiae* were identified by peptide mass fingerprinting (MALDI-TOF/TOF), showing that they were different enzymes. Based on their high homology with other phylogenetically related fungal BGLs, specific primers were designed that allowed sequencing of the genes encoding each enzyme. Analysis of the amino acid sequences showed that BGL-1 is a member of the family 1 of glycosyl hydrolases, while BGL-2 and BGL-3 belong to family 3. Given that there are few fungal BGLs crystallized, structural models of BGL-2 and BGL-3 were constructed on the basis of their identity (~ 65%) with BGLs from *Hypocrea jecorina* and *Aspergillus aculeatus*, respectively. These enzymes exhibited domains described in other fungal BGLs, highlighting the presence of a cellulose-binding domain in BGL-2.

### **Saccharification of slurry from wheat straw**

Since the efficient hydrolysis of a complex lignocellulosic biomass is a key step toward the conversion of agricultural residues into value-added products, the activity of *T. amestolkiae* crudes on saccharification of wheat straw slurry from acidic steam-explosion was investigated. Either alone or in combination with other commercial cocktails used for saccharification, the slurry was efficiently hydrolyzed. The results indicated that the fungus secretes, besides cellulases, some additional enzymes that could enhance fermentable sugars release.

### **Secretome analysis**

In order to analyze in depth the enzymes produced by the fungus in the presence of different lignocellulosic sources, the secretome from cultures with either Avicel or slurry as carbon source was analyzed. In both conditions, CBHs were the most abundant enzymes, followed by BGLs. However, in the slurry-induced culture, the proportion of BGL and enzymes other than cellulases increased. This indicates that greater enzymatic diversity is necessary for degradation of a complex substrate. In this case, enzymes involved in degradation of both cellulose and other components of the plant cell wall are required. The results obtained open new routes for the development of effective enzyme cocktails in the context of degradation of lignocellulosic biomass.

## ***Conclusions***

In this work, *T. amestolkiae* has been identified and described for the first time as a cellulolytic fungus. This species produces an enzymatic cocktail rich on BGLs, which are the limiting enzymes in the hydrolysis of cellulose. Three extracellular BGLs secreted by the fungus have been purified and biochemically characterized. Their different properties could be of interest for bioethanol production. In addition, all the BGLs showed high transglycosilation activity, allowing the synthesis of several alkyl-glucosides and celooligosaccharides. The enzymatic crude of *T. amestolkiae* has been used for supplementing BGL-deficient commercial cocktails, enhancing glucose release from wheat straw slurry obtained by acidic steam explosion. The results obtained suggest that BGLs from *T. amestolkiae*, as well as other accessory proteins present in the new enzyme cocktail, could be of interest for biotechnological plant biomass applications.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

$\epsilon_{410}$	Coefficiente de extinción molar a 410 nm
2G	Segunda generación
4-MUG	4-metilumberilferil- $\beta$ -D-glucopiranosido
Å	Angstrom
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNr	ADN ribosómico
Aminoácidos	
Ala/A	Alanina
Arg/R	Arginina
Asn/N	Asparagina
Asp/D	Ácido aspártico
Cys/C	Cisteína
Gln/Q	Glutamina
Glu/E	Ácido glutámico
Gly/G	Glicina
His/H	Histidina
Ile/I	Isoleucina
Leu/L	Leucina
Lys/K	Lisina
Met/M	Metionina
Phe/F	Fenilalanina
Pro/P	Prolina
Ser/S	Serina
Thr/T	Treonina
Trp/W	Triptófano
Tyr/Y	Tirosina
Val/V	Valina
Amp	Ampicilina
$A_n$	Absorbancia a una longitud de onda n
ARN	Ácido ribonucleico
Avi	Avicelasa
Bases nitrogenadas	
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
BGL	$\beta$ -glucosidasa
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
BSTFA	bis-trimetilisilil trifluoroacetamida
Bt2	$\beta$ -tubulina 2
BuG	Butilglucósido



BuOH	Butanol
C2	Celobiosa
C3	Celotriosa
C4	Celotetraosa
C5	Celopentaosa
C6	Celohexaosa
CAZy	<i>Carbohydrate Active Enzymes database</i>
CBD	Dominio de unión a celulosa ( <i>Cellulose Binding Domain</i> )
CBH	Celobiohidrolasa
CBM	Módulo de unión a la celulosa ( <i>Carbohydrate Binding Module</i> )
CBS	<i>CentraalBureau voor Schimmelcultures</i>
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CMC	Carboximetilcelulosa
CSS	Maíz macerado sólido ( <i>Corn Steep Solid</i> )
CYA	Autolisado de levadura de Czapek ( <i>Czapek Yeast Autolysate</i> )
DTT	Ditiotreitol
EC	Número de identificación de la enzima ( <i>Enzyme Commission number</i> )
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético ( <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i> )
EG	Endoglucanasa
EM	Espectrometría de masas
endo-H	endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa
EtG	Etilglucósido
EtOH	Etanol
FnIII	Fibronectina tipo III
GH	Glicosil hidrolasas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
ITS	Espaciadores transcritos internos ( <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
IUBMBM	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular ( <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> )
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
$k_{\text{cat}}$	Constante catalítica
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$	Eficiencia catalítica
kDa	kiloDalton
$K_{\text{i}}$	Constante de inhibición
$K_{\text{m}}$	Constante de Michaelis-Menten
KOG	<i>euKaryotic Orthologous Groups</i>
LB	<i>Luria-Bertani</i>
MALDI-MS	Espectro de masas de MALDI
MALDI-MS/MS	Espectro de fragmentación de MALDI
MALDI-TOF	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz con un analizador de tiempo de vuelo ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i> )
MALDI-TOF/TOF	MALDI con un analizador TOF en tándem
MEA	Agar de extracto de malta ( <i>Malt Extract Agar</i> )
MeG	Metilglucósido

MeOH	Metanol
$M_w$	Masa molecular ( <i>Molecular weight</i> )
NanoLC-MS/MS	Nanocromatografía líquida acoplada a un tándem de espectrometría de masas ( <i>Nanoscale Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry</i> )
NCBI <sub>nr</sub>	<i>National Center for Biotechnology Information (non-redundant)</i>
<i>o</i>	<i>orto-</i>
<i>o</i> NPG	<i>o</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido
<i>p</i>	<i>para-</i>
PAS	Ácido periódico de Schiff ( <i>Periodic Acid-Schiff</i> )
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDA	Agar de patata y dextrosa ( <i>Potato Dextrose Agar</i> )
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pI	Punto isoelectrico
PNGasa F	N-glicosidasa F
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> NPG	<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido
PrG	Propilglucósido
PrOH	Propanol
PSM	Relación péptido-espectro ( <i>Peptide-Spectrum Match</i> )
RPB1	ARN polimerasa II
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico ( <i>Dodecyl Sulfate PolyAcrilamide Gel Electrophoresis</i> )
SEM	Microscopio electrónico de barrido ( <i>Scanning Electron Microscope</i> )
SHF	Hidrólisis y fermentación separadas ( <i>Separate Hydrolysis and Fermentation</i> )
SSF	Sacarificación y fermentación simultáneas ( <i>Simultaneous Sacharification and Fermentation</i> )
$T_a$	Temperatura de anillamiento
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético ( <i>TriuFluoroacetic Acid</i> )
$t_R$	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible
$V_{max}$	Velocidad maxima
YES	Extracto de levadura y sacarosa ( <i>Yeast Extract Sucrose</i> )
$\delta$ -Gl	$\delta$ -gluconolactona

---



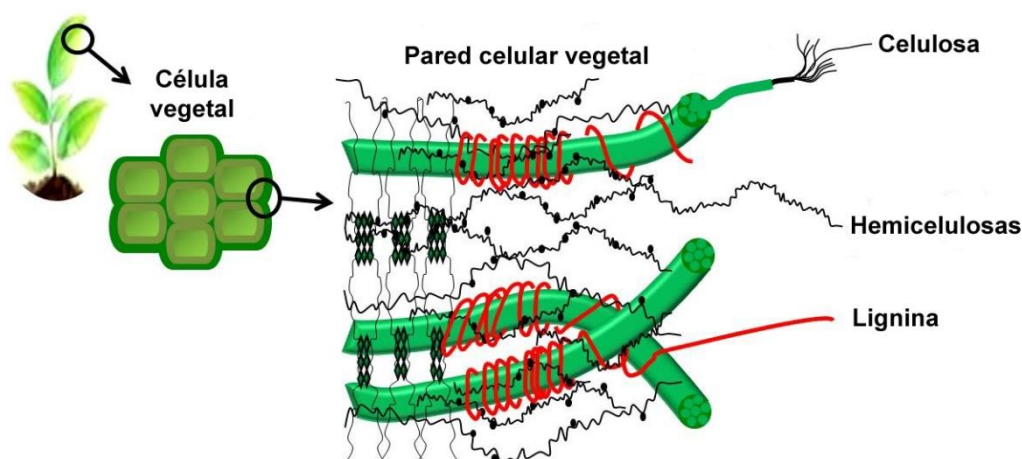
# 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1.1.BIOMASA LIGNOCELULÓSICA: LA PARED CELULAR VEGETAL

La biomasa vegetal constituye una fuente de energía renovable. Mediante el proceso de fotosíntesis, anualmente se fijan en la biosfera más de  $10^{11}$  toneladas de materia orgánica (Leschine, 1995). Más de la mitad de ese peso procede de la pared celular de las plantas, formada por varias capas concéntricas, morfológicamente diferentes, que contienen celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 1.1). La composición y porcentajes de estos polímeros varían entre las especies vegetales e incluso en una misma planta, de acuerdo con la edad, el tejido y la etapa de crecimiento de la misma. Aunque estos tres componentes proporcionan rigidez a la pared celular vegetal, ésta es una entidad dinámica y metabólicamente activa que juega un papel crucial en el crecimiento, diferenciación y comunicación entre las células (Zhang y Lynd, 2004) (Tabla 1.1).



**Figura 1.1.** Estructura de la pared celular vegetal. Adaptada de Tomme *et al.* (1995).

Industrialmente, la biomasa lignocelulósica es una materia prima muy interesante debido a su alto contenido en azúcares fermentables procedentes de la celulosa y la hemicelulosa, y al potencial empleo de éstos en la producción de biocombustibles de segunda generación (2G). La principal limitación para aprovechar estos polisacáridos reside en la falta de métodos eficaces para degradar la lignina, la barrera que protege a la planta (Apartado 1.1.1.3).

**Tabla 1.1.** Porcentaje en peso seco de la composición de la pared celular de diferentes fuentes lignocelulósicas (Chandel y Singh, 2011).

Fuente lignocelulósica		Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
<b>Maderas duras</b>	Abedul	40,0	23,0	21,0
	Sauce	37,0	23,0	21,0
	Álamo	51,0	29,0	16,0
<b>Maderas blandas</b>	Picea	43,0	26,0	29,0
	Pino	46,4	8,8	29,4
<b>Residuos agrícolas</b>	Paja de trigo	38,2	21,2	23,4
	Rastrojo de maíz	37,5	22,4	17,6
<b>Cultivos energéticos</b>	<i>Miscanthus giganteus</i>	40,0	18,0	25,0
	<i>Panicum virgatum</i>	31,0	20,4	17,6

1.1.1. Componentes de la lignocelulosa

1.1.1.1. Celulosa

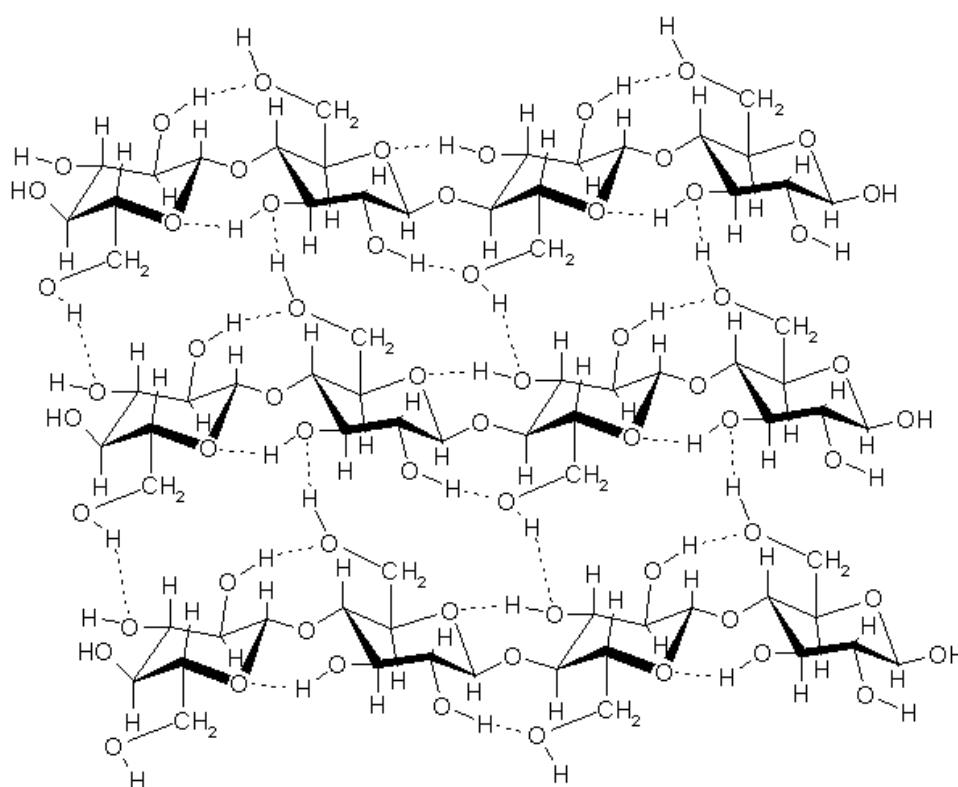
La celulosa es el compuesto orgánico más abundante de la Tierra, y el principal componente de la pared celular vegetal. Se trata de un polímero lineal de moléculas de D-glucosa, unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 (Figura 1.2). Sus extremos son asimétricos: los que contienen el carbono anomérico libre de la molécula de glucosa se conocen como extremos reductores, mientras que los que tienen el carbono anomérico implicado en un enlace son los extremos no reductores (Pettersen, 1984). Dependiendo de su origen, la celulosa puede tener un grado de polimerización de entre 2.000 a 25.000 unidades de glucosa (Hilden y Johansson, 2004; Levy *et al.*, 2002).

Cada una de las unidades de glucosa de la cadena lineal están rotadas 180° con respecto a las glucosas colindantes a lo largo del eje. Debido a la ausencia de ramificaciones, la cadena de celulosa tiene una estructura plana estabilizada mediante puentes de hidrógeno entre los múltiples grupos hidroxilo de la misma cadena (intramoleculares) o entre cadenas adyacentes (intermoleculares), que las mantienen firmemente unidas, lo que contribuye a proporcionar rigidez a la pared celular (Klemm *et al.*, 2005; O'Sullivan, 1997).

En relación a la cantidad de puentes de hidrógeno en las moléculas de celulosa, se ha propuesto un modelo estructural con dos estados: cristalino y amorfo. Las regiones cristalinas están altamente organizadas (mayor número de puentes de hidrógeno), hacen a la celulosa insoluble en la mayoría de disolventes (incluido el agua), y dificultan que sea atacada por enzimas (Himmel *et al.*, 2007). Estas regiones están separadas por zonas amorfas, que se presentan en pequeños porcentajes (de 5 a 20%). Son menos ordenadas y compactas y tienen mayor capacidad para absorber

moléculas de agua, lo que confiere a esta celulosa gran flexibilidad y cierta solubilidad (Cowling, 1975), además de hacerla más susceptible a la degradación enzimática (Beguin y Aubert, 1994).

En la naturaleza, la celulosa no se encuentra en forma de cadenas sencillas, sino que desde su síntesis éstas se ordenan en filamentos que forman las fibrillas elementales (1,5-3,5 nm), microfibrillas (10-30 nm) y macrofibrillas (100 nm), que se asocian mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Lynd *et al.*, 2002).



**Figura 1.2.** Estructura de la celulosa (Laghi, 2013).

### 1.1.1.2. Hemicelulosa

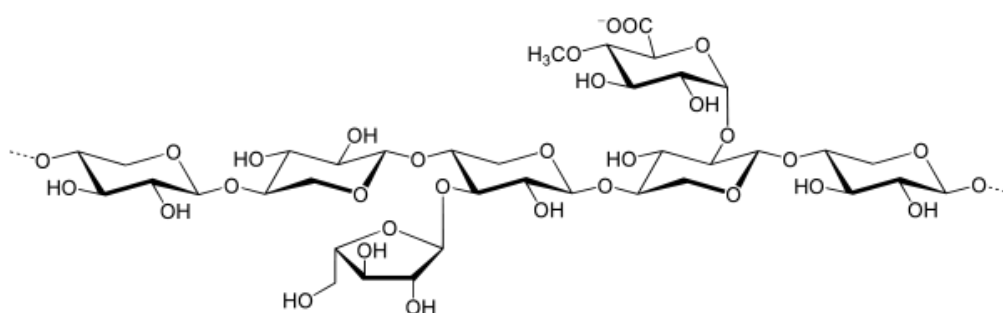
Las hemicelulosas no son moléculas homogéneas sino heteropolisacáridos complejos. Están formadas principalmente por pentosas ( $\beta$ -D-xilosa y  $\alpha$ -L-arabinosa), hexosas ( $\beta$ -D-glucosa,  $\beta$ -D-galactosa y  $\beta$ -D-manosa) y ácidos urónicos ( $\beta$ -D-glucurónico y  $\alpha$ -D-galacturónico). Algunas de estas unidades se encuentran usualmente acetiladas o metiladas.

En las angiospermas, o plantas de madera dura, la forma más abundante de hemicelulosa es el xilano (Figura 1.3), mientras que las gimnospermas, o plantas de madera blanda, contienen principalmente  $\beta$ -D-glucomanano (Kumar *et al.*, 2008).



En contraste con la celulosa, la hemicelulosa tienen una estructura ramificada, con cadenas laterales cortas formadas por los diferentes azúcares, lo que le confiere una naturaleza amorfa y facilita su degradación (Martínez *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2002).

La función más importante de la hemicelulosa es conectar la lignina y las fibras de celulosa, dando mayor rigidez a la red celulosa-hemicelulosa-lignina. La lignina y la hemicelulosa se mantienen unidas de manera predominante a través de enlaces tipo éter o éster, mientras que la unión con la celulosa es a través de puentes de hidrógeno.

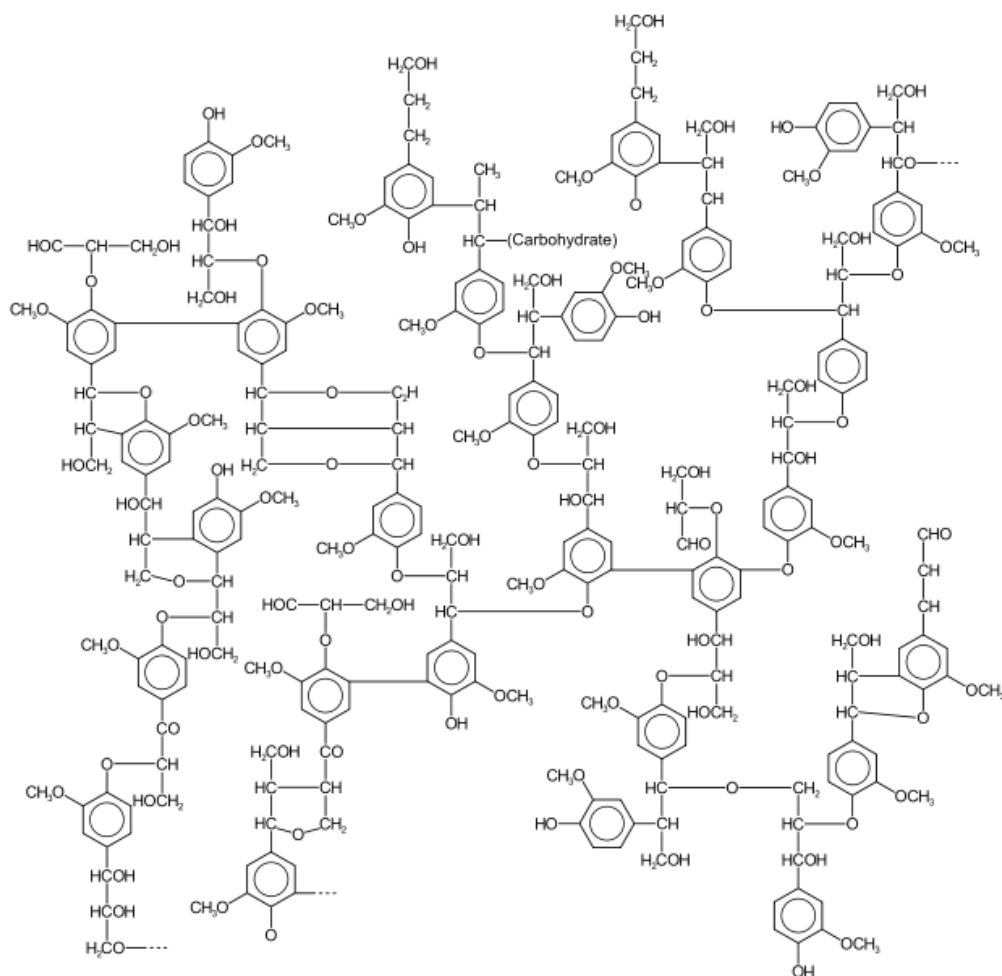


**Figura 1.3.** Estructura del xilano (Yikrazuul, 2009).

### 1.1.1.3. Lignina

La lignina es el componente más complejo y menos caracterizado de la pared celular. Está compuesta por la polimerización oxidativa y aleatoria de tres alcoholes de tipo fenilpropano (alcohol cumarílico, coniferílico y sinapílico), unidos por distintos enlaces covalentes (C-C y de tipo éter). Como consecuencia, se forma un polímero muy heterogéneo, insoluble, ramificado, y altamente resistente a la degradación química y biológica (Figura 1.4).

Junto con la hemicelulosa, la lignina crea una matriz amorfa en la que están embebidas las fibras de celulosa, actuando como material cementante entre las células. Juega un papel esencial en el transporte de agua y sales minerales y protege al resto de componentes de la pared celular vegetal del ataque de microorganismos (Sanchez, 2009). Sin embargo, para determinadas aplicaciones industriales basadas en el aprovechamiento de la celulosa y la hemicelulosa, la lignina es un componente indeseable, siendo necesaria su transformación a través de diferentes métodos (Apartado 1.5.1.2.1).



**Figura 1.4.** Estructura de la lignina (Adler, 1977).

### 1.1.2. Degradación de la lignocelulosa en la naturaleza

La degradación de la biomasa lignocelulósica es el paso central para el reciclado del carbono en los ecosistemas terrestres. Sin embargo, debido al carácter recalcitrante de varios componentes de la pared celular vegetal, solamente ciertos microorganismos son capaces de degradarla. Numerosos hongos filamentosos pueden modificarla o degradarla; en función de los patrones de degradación que producen sobre la biomasa lignocelulósica, podemos clasificarlos como hongos de podredumbre blanca, podredumbre parda y podredumbre blanda (Blanchette, 1991; Martínez *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2011; Schwarze *et al.*, 2000).

Los hongos de la podredumbre blanca son los únicos organismos capaces de degradar completamente la lignina, transformándola en CO<sub>2</sub> y agua (Kirk y Farrell, 1987). Sin embargo, no pueden utilizarla como única fuente de carbono y energía, degradándola para tener acceso a la celulosa y la hemicelulosa (Leatham, 1986). Típicamente causan blanqueamiento en la

madera, y la mayoría de ellos prefieren las angiospermas. Los hongos de la podredumbre parda, por su parte, atacan preferentemente a las gimnospermas, degradando los polisacáridos, a los que consiguen llegar modificando parcialmente la lignina (Martínez *et al.*, 2011; Yelle *et al.*, 2008). Los hongos de la podredumbre blanca y parda pertenecen al grupo de los basidiomicetos. Por el contrario, la mayoría de los hongos de podredumbre blanda pertenecen a los ascomicetos y actúan preferentemente sobre material vegetal con bajo contenido en lignina. Usualmente requieren contenidos más altos de humedad que los otros dos.

En la naturaleza, la degradación de la celulosa y la hemicelulosa tiene lugar cuando la estructura de la lignina es alterada, lo que facilita la colonización de nuevas poblaciones de microorganismos (Blanchette, 1995; Daniel *et al.*, 2003; Perestelo *et al.*, 1999). En este proceso actúan de forma coordinada diferentes enzimas conocidas generalmente como celulasas y hemicelulasas, pertenecientes al grupo de las glicosil hidrolasas, y cuyas características se detallan en el siguiente apartado.

## 1.2. GLICOSIL HIDROLASAS

### 1.2.1. Nomenclatura y clasificación

Las enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un compuesto no glucídico (aglicón) reciben el nombre de glicosil hidrolasas (GH). El enlace glicosídico es uno de los enlaces más estables que existen en la Naturaleza, con una vida media de más de 5 millones de años (Wolfenden *et al.*, 1998), por lo que las GH están consideradas como uno de los catalizadores más eficientes que se conocen.

Al igual que el resto de enzimas, las GH poseen un número EC (*Enzyme Commission number*), de acuerdo a la clasificación de la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). En esta clasificación, basada en las reacciones catalizadas por las enzimas (en concreto, en su capacidad para hidrolizar el enlace glicosídico) las GH están incluidas en el grupo EC 3.2.1.x.

Existe otra clasificación alternativa en base a la similitud de sus secuencias de aminoácidos, que aporta información sobre su estructura y proporciona relaciones filogenéticas entre las diferentes familias de las GH (Henrissat, 1991). Bajo esta clasificación, las GH se ordenaron inicialmente en 35 familias, aunque actualmente existen más de 130. Esta ordenación basada en la secuencia se ha hecho extensible al resto de enzimas que actúan sobre los polisacáridos y se encuentra recogida en la base de datos pública CAZy

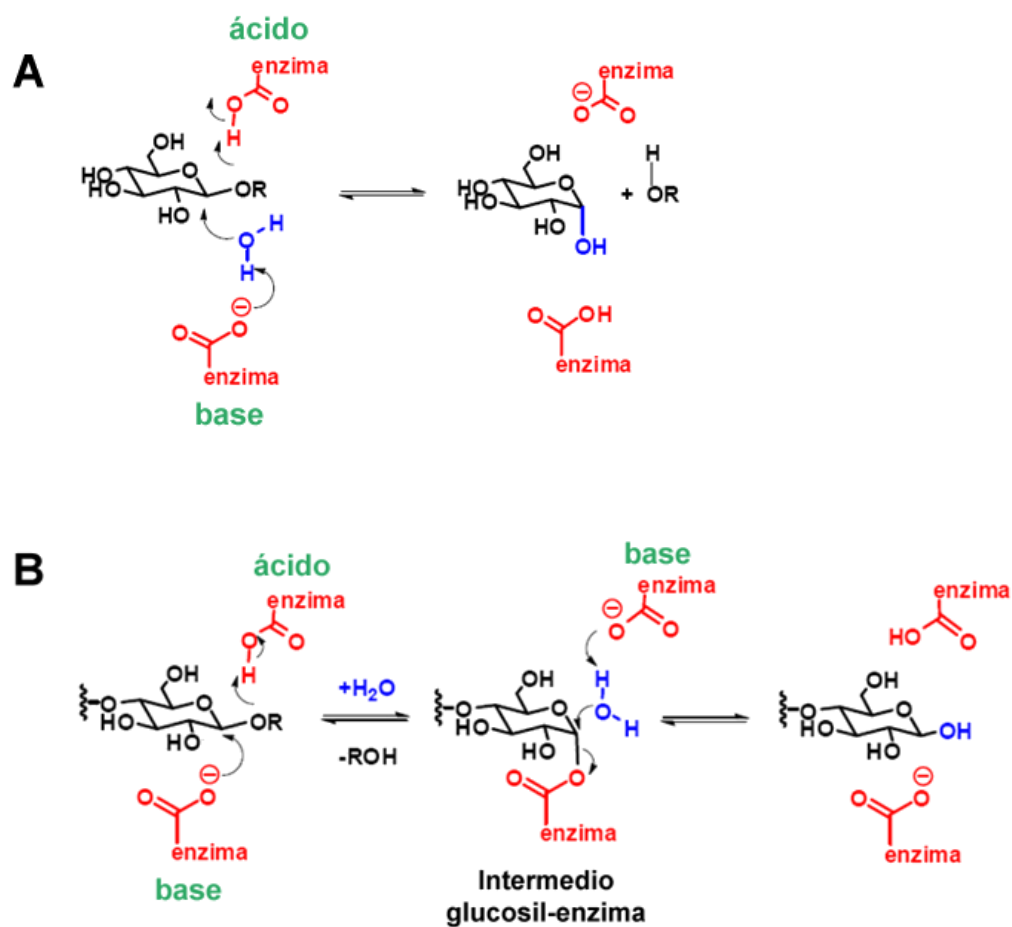
(*Carbohydrate Active Enzymes database*, <http://www.cazy.org/>) (Lombard *et al.*, 2014).

### 1.2.2. Mecanismos de hidrólisis del enlace glicosídico

Koshland (1953) propuso dos mecanismos de reacción estereoespecíficos diferentes para la ruptura del enlace glicosídico: inversión y retención. En ambos casos, la hidrólisis del enlace glicosídico está mediada por la acción de dos residuos catalíticos, generalmente dos residuos carboxílicos, presentes en el centro activo de la enzima. La Figura 1.5 muestra una representación de los dos tipos de mecanismos hipotéticos de las GH.

El mecanismo de inversión (Willner *et al.*, 2007) tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido-base (Figura 1.5A). Uno de los dos residuos carboxílicos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico y el otro, como ácido, asistiendo la separación del oxígeno. Esta sustitución nucleofílica genera un producto con estereoquímica opuesta al sustrato. En el mecanismo de retención (Figura 1.5B) tiene lugar un desplazamiento doble. El primer ataque nucleofílico al carbono anomérico es asistido por el residuo que actúa como base, formando un enlace covalente transitorio entre la enzima y el glicósido. El segundo ataque nucleofílico ocurre por la entrada de una molécula de agua que pierde un protón, con asistencia del residuo básico que en la primera etapa actuó como ácido. Como resultado, se deshace el estado transitorio y se regenera la enzima (Rye y Withers, 2000; Withers, 2001).

La principal diferencia estructural entre las GH que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos mediante mecanismo de retención o inversión, consiste en la distancia de separación entre sus grupos carboxilos. En las enzimas que operan con mecanismo de inversión, los residuos carboxílicos están separados alrededor de 9-10 Å, mientras que en las que lo hacen con mecanismo de retención están más próximos, 5-6 Å. La mayor distancia entre los residuos en las enzimas con mecanismo de inversión permitiría la entrada de agua más fácilmente (McCarter y Withers, 1994).



**Figura 1.5.** Posibles mecanismos de hidrólisis del enlace glicosídico: (A) inversión y (B) retención. Adaptada de [Williams \(2009\)](#).

### 1.3.HIDRÓLISIS DE LA CELULOSA

El estudio de la degradación de la celulosa se potenció durante la II Guerra Mundial en el Pacífico Sur, durante la cual gran parte del material militar del ejército de los Estados Unidos (hecho de algodón) sufrió un importante deterioro. En este contexto, [Mandels y Reese \(1957\)](#) identificaron al hongo filamentoso *Trichoderma reesei* como agente causante de esta degradación, debido a su capacidad para producir enzimas celulolíticas.

Durante la segunda mitad del siglo XX se desarrollaron numerosas investigaciones basadas en la capacidad de los microorganismos para degradar la celulosa, impulsadas con el avance de la biotecnología blanca. En concreto, *T. reesei* ha sido objeto de intensos estudios en el contexto de la conversión de biomasa lignocelulósica ([Herpoel-Gimbert et al., 2008](#)). Así, se han estudiado exhaustivamente la influencia de los principales factores que afectan a la producción de celulasas y las formulaciones de

medios de cultivo para el crecimiento de este hongo y, posteriormente, de sus mutantes (Le Crom *et al.*, 2009).

En la actualidad, sigue vigente el interés por estudiar los sistemas celulolíticos de los microorganismos productores de grandes cantidades de celulasas. El cribado de microorganismos productores, el incremento en la producción por mutaciones genéticas, la purificación y caracterización de los componentes del complejo, el estudio de los mecanismos de ataque a la celulosa, la obtención de proteínas recombinantes, la determinación de las estructuras tridimensionales y la demostración de su potencial industrial son aspectos relevantes en este campo (Bhat y Bhat, 1997; Foreman *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008). Concretamente, las celulasas pueden emplearse en diferentes sectores industriales, como el textil, farmacéutico, alimentario y, más recientemente, el de los biocombustibles 2G.

### 1.3.1. Enzimas del complejo celulolítico

De forma general, existen tres tipos de celulasas, que actúan de forma coordinada y sinérgica para degradar la celulosa hasta moléculas de glucosa (Figura 1.6). Estas enzimas se detallan a continuación.

#### 1.3.1.1. Endoglucanasas

Las endoglucanasas (EG, EC 3.2.1.4), hidrolizan aleatoriamente los enlaces glicosídicos internos de las regiones amorfas de la celulosa, generando oligosacáridos de diferentes longitudes y proporcionando nuevos extremos libres susceptibles de ser degradados por otras enzimas del sistema celulolítico (Aro *et al.*, 2005; Lynd *et al.*, 1991). Provocan un marcado decrecimiento de la longitud del polímero, así como un incremento equivalente de la concentración de azúcares reductores.

#### 1.3.1.2. Exoglucanasas

Las exoglucanasas, también llamadas celobiohidrolasas (CBH, EC 3.2.1.91), actúan progresivamente sobre los extremos de las cadenas de celulosa, liberando el dímero de glucosa (celobiosa) como principal producto. Las CBH se dividen en dos tipos: CBH I, que hidrolizan los extremos reductores, y CBH II, que actúan sobre los extremos no reductores. En estas enzimas es común encontrar inhibición por producto (Zhang y Lynd, 2004). Como resultado de su actuación se produce una rápida liberación de azúcares reductores aunque la longitud del polímero no disminuye significativamente. Las CBH son las enzimas mayoritarias en el sistema celulolítico, representando el 40-70% del componente total del sistema de celulasas y pueden hidrolizar la celulosa cristalina (Esterbauer *et al.*, 1991). La actividad exoglucanasa a menudo se relaciona con la



capacidad para hidrolizar celulosa con un alto grado de cristalinidad, como el Avicel (actividad avicelasa) (Apartado 3.5.5.1).

1.3.1.3.  $\beta$ -glucosidasas

Las  $\beta$ -glucosidasas (BGL), o  $\beta$ -1,4-glucosidasas (EC 3.2.1.21), catalizan la transformación de celobiosas y celooligosacáridos en glucosa. Este proceso completa la degradación de la celulosa y evita la acumulación de inhibidores de las CBH y las EG (celobiosas y oligosacáridos) (Emert y Brown, 1973; Workman y Day, 1982). Como éstas, las BGL también se pueden inhibir por su producto de hidrólisis (de Castro y Pereira, Jr., 2010; Leite *et al.*, 2008). Estas enzimas son especialmente importantes entre las celulasas por su distribución universal, su amplia especificidad de sustrato y su versatilidad para actuar en reacciones de hidrólisis o síntesis, dependiendo de las condiciones de reacción (Apartado 1.5).

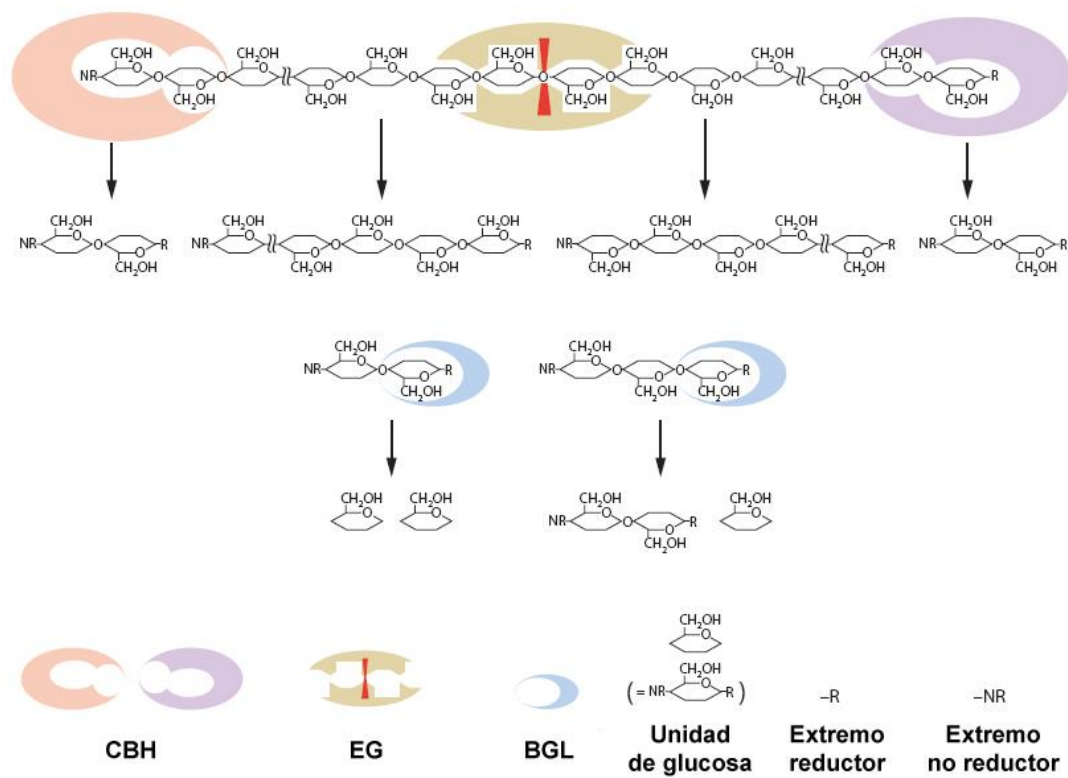


Figura 1.6. Esquema de la hidrólisis de la celulosa (Watanabe y Tokuda, 2010).

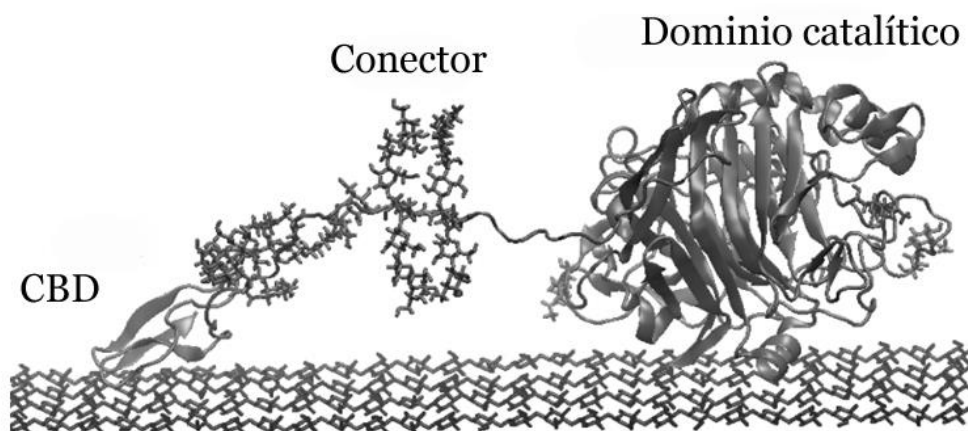
1.3.2. Estructura molecular de las celulasas

Las celulasas poseen una compleja arquitectura molecular que consta al menos de dos dominios diferentes: el dominio catalítico y el dominio de unión a la celulosa (Schulein, 1997) (Figura 1.7).

El dominio catalítico incluye más del 70% de la secuencia de la proteína y contiene el sitio activo, por lo que es responsable de la hidrólisis del enlace glicosídico. La especificidad de sustrato de una determinada celulasas se puede predecir con frecuencia en base a la estructura del sitio activo: la forma de hendidura o de bolsillo es característica de enzimas con actividad exo, mientras que la forma de túnel se da típicamente en enzimas de tipo endo. (Lynd *et al.*, 2002). A menudo este dominio se puede subdividir en varios dominios estructurales.

El dominio de unión a celulosa (CBD, *Cellulose Binding Domain*) favorece el acceso del dominio catalítico al sustrato, facilitando la hidrólisis, siendo especialmente importante en las etapas iniciales de unión al polímero (Teeri *et al.*, 1998). Los CBD están formados por entre 30 y 200 aminoácidos, pudiendo presentarse como un dominio simple, doble o triple en una misma proteína. Pueden localizarse tanto en el extremo C- como en el N-terminal o, más raramente, en una posición centrada. Los CBD provocan una asociación más estrecha y prolongada entre la enzima y el sustrato, incrementando la velocidad de hidrólisis, por lo que su eliminación disminuye drásticamente la actividad enzimática (Shoseyov *et al.*, 2006).

Entre el dominio catalítico y el CBD se encuentra una secuencia de entre 10 y 60 aminoácidos que actúa como conector flexible, lo que permite que ambos dominios actúen de forma independiente (Wilson e Irwin, 1999). Esta secuencia varía de una enzima a otra aunque su composición suele ser rica en treonina y serina, generalmente glicosiladas, lo que proporciona al conector rigidez y lo protege de la acción de proteasas (Srisodsuk *et al.*, 1993).



**Figura 1.7.** Estructura de una CBH de *T. reesei* (Zhong *et al.*, 2008).



### 1.3.3. Sinergia entre celulasas

Como se ha mencionado anteriormente, la celulosa está formada por zonas estrictamente amorfas y otras que presentan un alto grado de cristalinidad. Por ello, es necesaria la acción conjunta de diferentes celulasas sobre sus diferentes fracciones. La suma de las actividades individuales de las enzimas por separado es menor que la actividad celulolítica total de los sistemas celulolíticos en conjunto, fenómeno conocido como sinergia. Esto se debe a que la acción de unas enzimas libera productos susceptibles de ser transformados por otras, por lo que la concentración efectiva de sustratos varía a lo largo del tiempo de reacción cuando se ensayan mezclas complejas de celulasas (Lynd *et al.*, 2002).

Existen al menos cuatro formas de sinergia entre celulasas: i) Sinergia endo-exo entre las EG y CBH: las EG actúan en las regiones amorfas de las fibras de celulosa, proporcionando extremos reductores y no reductores susceptibles de ser hidrolizados por CBH I y CBH II, respectivamente (Henrissat *et al.*, 1985; Wood y McCrae, 1972); ii) sinergia exo-exo entre las CBH, procesando desde los extremos reductor y no reductor de las cadenas de celulosa (Fujita *et al.*, 2002; Medve *et al.*, 1994); (iii) sinergia entre las CBH y BGL, hidrolizando éstas los productos finales de las CBH (celooligosacáridos y celobiosa), lo que evita su inhibición (de Castro y Pereira, Jr., 2010; Lynd *et al.*, 2002); y iv) sinergia intramolecular entre los dominios catalíticos y los CBD, desorganizando e hidrolizando las fibras de celulosa (Karboune *et al.*, 2008).

Existe también sinergia entre celulasas y hemicelulasas para completar la degradación de los polisacáridos de la pared celular, lo que resulta especialmente importante en los procesos de sacarificación de materiales lignocelulósicos y su conversión en biocombustibles (Tabka *et al.*, 2006).

Además de las enzimas que degradan la lignocelulosa, recientemente se han descubierto otras enzimas no hidrolíticas implicadas en la remodelación de la pared celular que podrían facilitar su posterior degradación. En este grupo se encuentran las expansinas (Cosgrove, 2000; Tabuchi *et al.*, 2011), swolleninas (Jaeger *et al.*, 2011; Saloheimo *et al.*, 2002) y looseninas (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2011).

## 1.4. CELULASAS FÚNGICAS

El éxito evolutivo de numerosos microorganismos en su hábitat natural depende del uso de los polímeros de la pared celular vegetal como fuente de carbono y, por tanto, podrían emplearse como fuentes potenciales de enzimas celulolíticas. Aunque existen diferentes complejos enzimáticos bacterianos comercializados, principalmente de *Clostridium*, *Cellulomonas*

y *Thermomonospora* (Kuhad *et al.*, 2011), la mayor parte de las celulasas comerciales proceden de hongos filamentosos. Esto es debido a que producen enzimas extracelulares en mayor cantidad y normalmente poseen alta eficacia catalítica. Desde 1976 se han aislado más de 14.000 especies fúngicas degradadoras de celulosa, aunque los crudos enzimáticos comercializados proceden mayoritariamente de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Kuhad *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2008). En la Tabla 1.2 se resumen las principales características de las enzimas celulolíticas fúngicas.

**Tabla 1.2.** Características de los tres grupos de enzimas celulolíticas fúngicas y sus principales características. Adaptada de Dashtban *et al.* (2009).

Enzima	Sustrato óptimo	$M_w$ (kDa)	Familia GH	Tª óptima (°C)	pH óptimo	Glicosilación
EG	Celulosa (regiones amorfas)	Monomérico (22-45)	5, 6, 7, 9, 12, 45, 48, 61, 74	50-70	4-5	Ninguna o muy baja
CBH	Celulosa (regiones cristalinas)	Monomérico (50-65)	6, 7, 9	37-60	4-5	Ninguna o muy baja
BGL	Celobiosa y celooligosacáridos	Monomérico, dimérico, trimérico (35-450)	1, 3	45-75	Varía con la localización	Usualmente alta

#### 1.4.1. *T. reesei* como modelo de microorganismo productor de celulasas

Desde el descubrimiento de su potencial como productor de celulasas, el ascomiceto *T. reesei* (anamorfo de *Hypocrea jecorina*) ha centrado el interés de numerosos estudios. Concretamente, la obtención de mutantes hiperproductores de celulasas es parte de un proyecto nacional activo desde 1970 en Japón, destinado a la producción de celulasas para la generación de combustibles alternativos al petróleo (Nitta *et al.*, 2012). Como resultado de este proyecto se obtuvieron dos importantes mutantes, KDG-12 y PC3-7 (Kawamori *et al.*, 1985). Actualmente, el mutante más estudiado y utilizado es la cepa RUT-C30, capaz de producir de 15 a 20 veces más celulasas que la cepa parental QM6a, además de evitar la represión catabólica por glucosa (Peterson y Nevalainen, 2012). Estas características han convertido a RUT-C30 en la cepa de referencia entre los hongos con alta producción de celulasas (Le Crom *et al.*, 2009). El estudio de los distintos mutantes generados ha permitido mejorar la producción de enzimas celulolíticas a escala industrial, así como entender la regulación de su expresión en *T. reesei*.

Actualmente, la mayor parte de los preparados comerciales empleados en la sacarificación de biomasa lignocelulósica provienen de *T. reesei* y *Trichoderma longibrachiatum* (Singhania *et al.*, 2010) (Tabla 1.3). Sin embargo, el análisis del secretoma y el genoma de *T. reesei* ha confirmado que, aunque produce altas cantidades de celulasas, posee pocos genes que las codifiquen. De los 200 genes que codifican proteínas de las distintas familias de GH, solo codifican 2 CBH y 7 EG (Foreman *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2008). Además, solo 4 de estas celulasas son secretadas en grandes cantidades al medio, 2 EG y 2 CBH (Gusakov, 2011; Rosgaard *et al.*, 2007; Sukumaran *et al.*, 2005). Por otro lado, aunque se han identificado hasta 15 genes que codifican BGL en el genoma de *T. reesei*, solo constituyen el 0,5% del total de las celulasas secretadas, ya que la mayoría son intracelulares (Foreman *et al.*, 2003; Ouyang *et al.*, 2006). Esta es una de las razones por las que las BGL extracelulares de este hongo son insuficientes para completar la conversión de celobiosa y otros celooligosacáridos en glucosa, por lo que las preparaciones del género *Trichoderma* son usualmente suplementadas con BGL procedentes de otros microorganismos (Gusakov, 2011; Kumar *et al.*, 2008; Lynd *et al.*, 2002; Merino y Cherry, 2007; Nieves *et al.*, 1998).

#### 1.4.2. *Penicillium* productores de celulasas

El empleo de crudos enzimáticos producidos por especies de *Penicillium* como alternativa a los procedentes de *T. reesei* para la producción de biocombustibles de segunda generación ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años (Gusakov, 2011; Skomarovsky *et al.*, 2005).

Filogenéticamente, el género *Penicillium* pertenece a la familia *Trichomaceae*, en la que están aceptadas más de 250 especies (Houbraken y Samson, 2011). Los hongos de este género se caracterizan por formar conidios en una estructura ramificada y se clasifican en subgéneros según el nivel de ramificación (verticilio). Las cepas de *Penicillium* con reproducción sexual corresponden a los géneros teleomórficos *Eupenicillium* y *Talaromyces* (Pitt y Hocking, 1997).

Las especies de *Penicillium* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiendo crecer sobre los más diversos sustratos: granos, paja, cueros, frutas, etc. Algunas son cruciales en la producción y maduración de quesos y varios productos cárnicos. También son la fuente principal de penicilina, el primer antibiótico comercializado para tratar infecciones bacterianas, descubierto por Alexander Fleming en 1928. Otras cepas de *Penicillium*, mejoradas genéticamente, se usan para la producción industrial de enzimas como lipasas, pectinasas o glucosa oxidasa (Godfrey y West, 1996). Aunque existen varias especies de *Penicillium* que han sido descritas como fuente de celulasas y hemicelulasas (Chavez *et al.*, 2006), la

mayoría no han sido comercialmente explotadas. Una excepción es Rovabio® Excel, una preparación comercial de *Penicillium funiculosum* que posee alta actividad celulasa y xilanasa, comercializada por la compañía francesa Adisseo. En la última década se han descrito celulasas de *Penicillium brasilianum* (Jorgensen *et al.*, 2005; Jorgensen y Olsson, 2006), *Penicillium echinulatum* (Martins *et al.*, 2008; Sehnem *et al.*, 2006), *Penicillium decumbens* (Sun *et al.*, 2008), *P. funiculosum* (Guais *et al.*, 2008), *Penicillium janthinellum* (Adsul *et al.*, 2007), *Penicillium pinophilum* (Joo *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2009), *Penicillium purpurogenum* (Lee *et al.*, 2010) y *Penicillium pulvillorum* (Marjamaa *et al.*, 2013).

Además de la alta actividad BGL de los complejos celulolíticos secretados por las especies de *Penicillium* (Berlin *et al.*, 2005a; Berlin *et al.*, 2006; Castellanos *et al.*, 1995; Jorgensen *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2009), el empleo de crudos producidos por estos hongos en procesos de sacarificación en lugar de los procedentes de *Trichoderma* presenta otras ventajas. Una de ellas es la alta actividad específica de sus CBH (Bhiri *et al.*, 2010; Morozova *et al.*, 2010). Las enzimas de *Penicillium* parecen tener menos afinidad por la lignina y ser menos susceptibles a la inhibición por compuestos derivados de ella (Berlin *et al.*, 2005a; Berlin *et al.*, 2005b; Berlin *et al.*, 2006). Esta última propiedad es una característica importante en la optimización de las dosis de enzimas en los tratamientos de material lignocelulósico.

### 1.4.3. Otros hongos

*Aspergillus niger* y otros hongos del género *Aspergillus* han sido hongos ampliamente explotados en la producción industrial de enzimas durante décadas. La mayoría de investigaciones relacionadas con estos hongos se ha enfocado en la producción de enzimas que degradan hemicelulosa y pectina. Aunque poseen una variedad de genes que codifican EG y CBH en sus genomas, nunca han sido considerados seriamente como alternativa a *T. reesei* como productores comerciales de celulasas, probablemente por el hecho de que estas enzimas no se secretan en grandes cantidades. Sin embargo, podrían utilizarse para completar los cócteles enzimáticos para degradar la lignocelulosa ya que producen altos niveles de hemicelulasas, (xilanasas, xiloglucanasas y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas) (Berlin *et al.*, 2005a; de Vries y Visser, 2001).

El termófilo *Humicola insolens* es otro productor de celulasas industrialmente interesante, aunque sus preparaciones suelen emplearse preferentemente en aplicaciones textiles y de fabricación de pasta de papel, (Lynd *et al.*, 2002; Schulein, 1997).

En la actualidad, las alternativas más interesantes a *Trichoderma* para la producción de celulasas son *Acremonium cellulolyticus* (Fujii *et al.*, 2009; Ikeda *et al.*, 2007), recientemente renombrado como *Talaromyces* (Fujii *et al.*, 2014), y *Chrysosporium lucknowense* (Gusakov, 2007), en ambos casos por producir todas las enzimas del complejo celulolítico en proporciones adecuadas para una conversión eficiente de la biomasa lignocelulósica.

## 1.5.APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS CELULASAS

### 1.5.1. Bioetanol de segunda generación

La producción de bioetanol a partir de fuentes renovables constituye una forma de energía alternativa que podría satisfacer la alta demanda energética mundial (Li *et al.*, 2009). El empleo de biocombustibles se ha extendido en las últimas décadas debido a la creciente preocupación medioambiental, la disminución de las reservas mundiales de energías fósiles (lo que hace que aumente su coste) y el cambio climático global producido por el incremento de las emisiones de CO<sub>2</sub>.

El etanol es un líquido incoloro y biodegradable que puede emplearse como sustituto o aditivo de la gasolina. Su utilización en el sector del transporte, podría reducir el calentamiento global del planeta, ya que contribuye a producir un balance más favorable entre el CO<sub>2</sub> fijado por las plantas y el liberado en la combustión de este alcohol. Concretamente, el balance neto de CO<sub>2</sub> tras la combustión de bioetanol es nulo, ya que la cantidad de CO<sub>2</sub> que se genera es la misma fijada por las plantas durante la fotosíntesis, evitándose la movilización del carbono contenido en fuentes de energía no renovables como carbón o petróleo. Además, la utilización de bioetanol como combustible reduce la liberación a la atmósfera del monóxido de carbono (CO) producido en la combustión de la gasolina, mejorando así la calidad del aire. Los motores de la mayoría de vehículos actuales pueden funcionar con concentraciones bajas de etanol en gasolina (5-15%), aunque ya existen vehículos (flexifuel), que están adaptados para utilizar este alcohol a concentraciones mayores (85-100%). Esto representa una disminución en las emisiones de gases invernadero en comparación con las producidas por combustibles fósiles.

El bioetanol de primera generación se produce a partir de cultivos destinados a consumo humano o animal ricos en carbohidratos (caña de azúcar, remolacha, maíz, mandioca, etc.). Sin embargo, el empleo de este tipo de materias primas presentaba desventajas como la escasa variedad de cultivos de partida y la necesidad de destinar grandes extensiones de cultivo y alimentos a fines distintos a la alimentación humana o animal. Con objeto de salvar estas desventajas, se buscaron otros materiales de

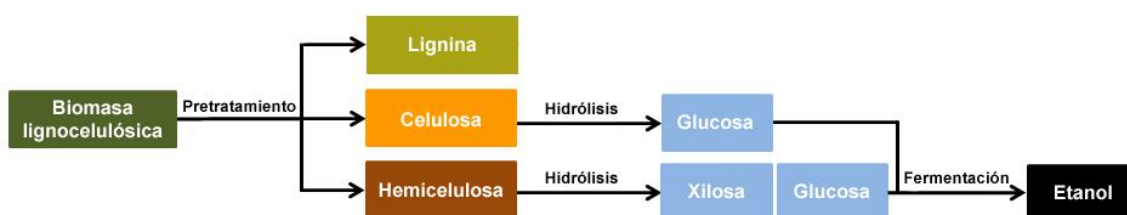


partida de menor coste que no compitieran con la cadena alimentaria. Así, apareció el bioetanol de segunda generación (Bioetanol 2G), en el que se aprovecha la biomasa lignocelulósica, cuya investigación se ha potenciado en los últimos años (Lin y Tanaka, 2006; Perez *et al.*, 2002).

Entre las principales fuentes de biomasa lignocelulósica destacan:

- Residuos agrícolas: paja de cereales (trigo, arroz, cebada), bagazo (caña de azúcar, sorgo dulce) o rastrojos.
- Residuos forestales: resultantes de los tratamientos silvícolas de corta, poda, clareo y entresaca. Su retirada es necesaria para evitar la propagación de plagas y de incendios forestales.
- Cultivos energéticos: procedentes de la explotación, en tierras marginales, de especies de alta producción de biomasa por hectárea. Los tres cultivos energéticos más utilizados son *M. giganteus*, *P. virgatum* y el álamo híbrido.

La bioconversión de residuos lignocelulósicos a bioetanol 2G requiere tres pasos de procesamiento (Figura 1.8) que se describen a continuación.



**Figura 1.8.** Esquema de la conversión de biomasa lignocelulósica a bioetanol.

#### 1.5.1.1. Pretratamiento

El pretratamiento consiste en la degradación o transformación de la lignina para hacer más accesible la celulosa y la hemicelulosa a las enzimas y así aumentar el rendimiento de la hidrólisis (Alvira *et al.*, 2010; Mosier *et al.*, 2005).

Para obtener el máximo rendimiento, el pretratamiento debe permitir una alta recuperación de los carbohidratos sin descomponerlos, evitando la producción de inhibidores que puedan afectar negativamente los pasos posteriores del proceso (Klinke *et al.*, 2004).

Los principales métodos de pretratamiento para obtener bioetanol 2G pueden dividirse en cuatro tipos (Sun y Cheng, 2002).

- Físicos. Se utilizan procesos físicos para reducir el tamaño de la biomasa. Ésta es cortada o pulverizada mediante trituración, astillado, peletizado o molienda para aumentar la relación superficie/volumen de las partículas. Otros procesos físicos incluyen el empleo de radiaciones (rayos  $\gamma$ , haz de electrones, microondas), técnicas hidrotérmicas y pirólisis. El coste energético de estos procesos es el factor limitante de este tipo de pretratamiento y depende del tamaño de partícula que se quiera alcanzar y del material lignocelulósico de partida.
- Físico-Químicos. Se combinan procesos físicos y químicos. Dentro de este grupo se encuentran la explosión con vapor o *steam explosion* (el método más utilizado a escala industrial), la explosión con amonio, la termohidrólisis y la extrusión. La *steam explosion* consiste en tratar la biomasa lignocelulósica con vapor saturado a altas presiones, aplicando seguidamente una reducción repentina de la presión. De forma general, la biomasa se expone a 210-290 °C y 20-50 bares, en presencia de vapor de agua o ácido sulfúrico diluido durante 1-5 min, tras los cuales se disminuye bruscamente la presión hasta niveles atmosféricos (Balat *et al.*, 2008; Hamelinck *et al.*, 2005; Mosier *et al.*, 2005). Mediante este proceso se incrementa el rendimiento de la hidrólisis de la celulosa por liberación de las fibras. Sin embargo, durante el proceso hay degradación de los azúcares de los polisacáridos, que dan lugar a ácido acético y furfurales, y de la lignina, que originan fenoles libres, que actúan como inhibidores del proceso. En el caso de la *steam explosion* ácida, se solubiliza la hemicelulosa, facilitando la degradación de la celulosa, pero también se generan mayor cantidad de inhibidores (Alvira *et al.*, 2010). En la explosión con amonio el tratamiento es similar pero se utilizan amonio y temperaturas inferiores (60-100°C), aunque también existe una fase de descompresión (Sarkar *et al.*, 2012). En la termohidrólisis la biomasa se trata a altas temperaturas (160-230 °C) y presión (> 50 bares) durante 20 min, produciéndose elevadas tasas de recuperación de azúcares en ausencia de inhibidores, aunque su coste económico es mayor que el de la *steam explosion* (Sousa *et al.*, 2009). Finalmente, la extrusión es un novedoso método físico-químico que consiste en la desestructuración de la biomasa mediante calor, compresión y fuerzas de cizallamiento, provocándole modificaciones químicas al tratarla con soluciones alcalinas tras el paso por el extrusor (Alvira *et al.*, 2010). En todos los casos, el material desestructurado que se obtiene se denomina *slurry*.
- Químicos. Se utilizan productos químicos como el ozono, ácidos, bases, peróxidos o solventes orgánicos. Los tratamientos con ácido (sulfúrico o clorhídrico) son los más estudiados ya que solubilizan la hemicelulosa y mejoran la hidrólisis de la celulosa, al igual que la *steam explosion* ácida.

La adición de bases (hidróxidos de sodio o potasio) favorece la solubilización de la lignina y reduce el grado de cristalinidad de la celulosa y el grado de polimerización de la hemicelulosa. El peróxido de hidrógeno también se utiliza para eliminar la lignina y aumentar la solubilización de la hemicelulosa. Por último, el proceso con solventes orgánicos (metanol, etanol o acetona) facilita la ruptura de los enlaces entre la lignina y la hemicelulosa, y entre éstas y la celulosa. Todos estos procesos tienen un coste alto y un inconveniente adicional: la eliminación de los solventes antes de continuar con las etapas siguientes del proceso.

- **Biológicos.** En este tratamiento el material lignocelulósico se somete a la acción de determinados microorganismos que degradan la lignina. Aunque también se han utilizado bacterias, los organismos más estudiados para realizar estos tratamientos son los hongos basidiomicetos de podredumbre blanca, por su capacidad para degradar la lignina ([Apartado 1.1.1.3](#)). Es un procedimiento respetuoso con el medio ambiente y no produce inhibidores que puedan afectar negativamente al resto del proceso. Sin embargo, no todos los basidiomicetos de podredumbre blanca son recomendables para estos tratamientos ya que algunos de estos hongos consumen muchos de los azúcares simples liberados a partir de la celulosa y la hemicelulosa, afectando negativamente al rendimiento final del proceso ([Salvachúa et al., 2011](#)). Además, los pretratamientos biológicos tienen la desventaja de ser lentos y producir generalmente menores rendimientos que los obtenidos con los métodos físico-químicos.

#### **1.5.1.2. Hidrólisis enzimática (sacarificación)**

Después del pretratamiento, la celulosa y la hemicelulosa se hidrolizan a azúcares fermentables (hexosas y pentosas, respectivamente) mediante la hidrólisis enzimática llevada a cabo por celulasas y hemicelulasas.

La hidrólisis enzimática de la celulosa, descrita en el [Apartado 1.3](#), está limitada por varios factores tales como la cristalinidad y grado de polimerización del polisacárido, su contenido en agua, el área superficial disponible y la degradación previa de la lignina ([Chang y Holtzapple, 2000](#); [Laureano-Perez et al., 2005](#)).

Muchas especies fúngicas de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus* son capaces de producir grandes cantidades de celulasas y hemicelulasas extracelulares ([Apartado 1.4](#)). Sin embargo, para una hidrólisis eficiente se necesitan enzimas eficaces y que toleren a altas temperaturas y bajo pH, ya que la mayor parte de pretratamientos utilizados industrialmente se basan en el uso de ácidos y calor ([Turner et al., 2007a](#)). Además, las enzimas termoestables presentan varias ventajas como



estabilidad y actividad específica más altas, mejorando así el proceso hidrolítico (Viikari *et al.*, 2007).

Los cócteles enzimáticos empleados en la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica contienen enzimas de las tres clases de celulasas (EG, CBH y BGL) y otras complementarias que pueden hidrolizar hemicelulosa y pectina y/o facilitan la desestructuración de la pared celular vegetal. La eficiencia hidrolítica de estos complejos enzimáticos depende tanto de las propiedades individuales de cada enzima (eficiencia catalítica, estabilidad a temperatura alta y pH ácido), como de sus proporciones en el cóctel enzimático (Gusakov *et al.*, 2007; Van Dyk y Pletschke, 2012).

La **Tabla 1.3** recoge los principales cócteles enzimáticos comercializados para hidrolizar la celulosa. Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los preparados comerciales utilizados en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica proceden de *T. reesei* y *T. longibrachiatum* (Singhania *et al.*, 2010). Sin embargo, éstos suelen producir bajas cantidades de BGL, por lo que para mejorar el rendimiento de la hidrólisis estos preparados tienen que ser suplementados con BGL procedentes de *A. niger* o diferentes especies de *Penicillium* (Gusakov *et al.*, 2007; 2011; Merino y Cherry, 2007; Singhania *et al.*, 2010).

Entre los cócteles enzimáticos más empleados se encuentran Celluclast 1.5 L (actividades mayoritarias EG y CBH), Ultraflo L (actividades mayoritarias EG y hemicelulasa) y NS 50010 (actividad mayoritaria BGL). Este último se utiliza comúnmente para suplementar la actividad BGL de otras preparaciones deficientes en ella.

### 1.5.1.3. Fermentación

Una vez hidrolizados enzimáticamente los azúcares de los polisacáridos de la pared celular vegetal, el siguiente paso en la producción de bioetanol es la fermentación microbiana. La fermentación puede llevarse a cabo de dos formas: i) independiente a la hidrólisis (*Separate Hydrolysis and Fermentation*, SHF) o ii) de forma simultánea (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*, SSF) (Wingren *et al.*, 2005).

**Tabla 1.3.** Celulasas comerciales, compañías que las producen y microorganismos de los que proceden.

Nombre comercial	Casa comercial	Microorganismo fuente
Celluclast 1.5L	Novozymes (Dinamarca)	<i>T. reesei</i>
NS 50010	Novozymes	<i>A. niger</i>
Cellulase 2000L	Rhodia-Danisco (Francia)	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Rohament CL	Rohm-AB Enzymes (Finlandia)	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Viscostar 150L	Dyadic (EE.UU.)	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Multifect CX 10L	Genencor (EE.UU.)	<i>T. reesei</i>
Bio-feed beta L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Energex L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Ultraflo L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Viscozyme L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Cellulyve	50L Lyven (Francia)	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
GC 440	Genencor-Danisco (EE.UU.)	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
GC 880	Genencor	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Specyme CP	Genencor	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
GC 220	Genencor	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Accelerase 1500	Genencor	<i>T. reesei</i>
Cellulase AP30K	Amano Enzyme (Japón)	<i>A. niger</i>
Cellulase TRL	Solvay Enzymes (EE.UU.)	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Econase CE	Alko-EDC (EE.UU.)	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Cellulase TAP106	Amano Enzyme	<i>T. viride</i>
Biocellulase TRI	Ques Intl (EE.UU.)	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>
Biocellulase A	Ques Intl	<i>A. niger</i>
Ultra-low microbial	Iogen (Canadá)	<i>T. longibrachiatum/ T. reesei</i>

*Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más comúnmente utilizada para la producción industrial de etanol a partir de glucosa. En esta etapa resulta de especial interés el empleo de microorganismos que puedan tolerar la presencia de inhibidores generados en el pretratamiento. Algunas estrategias consisten en aumentar la resistencia de *S. cerevisiae* mediante su adaptación paulatina al medio, aumentando progresivamente la dosis de inhibidores en los cultivos (Koppram y Olsson, 2014). Estudios de este tipo también se han llevado a cabo utilizando la bacteria *Zymomonas mobilis* (Rogers et al., 2007). Otras estrategias se basan en la búsqueda de organismos más tolerantes a inhibidores, y en el empleo de microorganismos que puedan fermentar la glucosa y la xilosa simultáneamente, con objeto de mejorar el rendimiento del proceso (Ask et al., 2013; Koppram y Olsson, 2014). En este sentido, levaduras como *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* y *Pichia stipitis*, son capaces de fermentar también la xilosa aunque los rendimientos de producto final obtenido son bajos, por lo que se han modificado mediante ingeniería

metabólica para obtener cepas que puedan fermentar los dos azúcares eficazmente (Zaldivar *et al.*, 2001). En los últimos años, la secuenciación del genoma de *P. stipitis*, un eficaz fermentador de xilosa, ha permitido identificar las rutas implicadas en el metabolismo de la xilosa, que posteriormente han sido introducidas por manipulación genética en *S. cerevisiae* (Saleh *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2007). Actualmente, ya se dispone de cepas transformadas de esta levadura que pueden fermentar xilosa. Además, se continúa trabajando en la incorporación de nuevos transportadores que permitan aumentar la eficacia de la co-fermentación (Goncalves *et al.*, 2014).

### 1.5.2. Otras aplicaciones

Las celulasas son enzimas útiles para diferentes sectores industriales. En la industria papelera, el uso de celulasas permite ahorrar energía durante el proceso de refino, porque facilitan el drenaje y mejoran las propiedades de los productos (Kuhad *et al.*, 2011). Se han empleado para potenciar los mecanismos de cohesión de las fibras incrementando la resistencia del papel, favorecer el proceso de destintado en el papel reciclado y tratar efluentes (Bajpai, 2004; Jeffries, 2008; Savitha *et al.*, 2009). En todas estas aplicaciones las EG tienen un papel crucial, actuando sobre la superficie de la pasta y contribuyendo a reducir las fibrillas rotas depositadas. Esto provoca una disminución de la viscosidad sin apenas hidrolizar la celulosa y favorece que se eliminen los restos de lignina superficial, lo que contribuye a aumentar la blancura de la pasta, incluso mejorando los resultados obtenidos con xilanasas (Mansfield *et al.*, 1996; Pere *et al.*, 1995).

En el caso de la industria textil, las celulasas se emplean en el lavado a la piedra (*biostoning*), técnica utilizada para producir aspecto descolorido en prendas vaqueras, sustituyendo los tratamientos tradicionales con piedra pómez (Belghith *et al.*, 2001; Bhat, 2000; Ng *et al.*, 2010). De nuevo, las enzimas más implicadas en este proceso son las EG, actuando sobre la superficie de las fibras y liberando parte del tinte azul índigo empleado en la coloración de la tela (Shimonaka *et al.*, 2006).

En la industria alimentaria, las celulasas se usan en la extracción y clarificación de jugos de frutas y verduras, en la producción de néctares de frutas y purés y en la extracción de aceite de oliva. También se añaden celulasas para mejorar el malteado de cebada en la fabricación de cerveza y en la industria del vino. Con el uso de estas enzimas y hemicelulasas se consigue una mejor maceración y clarificación de los zumos. Las celulasas también se usan en la extracción de carotenoides para su uso como colorante alimentario (Galante *et al.*, 1998).

Celulasas y hemicelulasas se emplean también en la producción de piensos para alimentación animal, mejorando su calidad nutritiva y digestibilidad (Graham y Balnave, 1995).

### 1.5.3. Aplicaciones específicas de BGL

#### 1.5.3.1. Hidrólisis de glicósidos

Además del papel esencial que juegan en la hidrólisis de la celulosa para la obtención de bioetanol (Apartado 1.5.1.2), las BGL cumplen otras funciones que pueden ser trasladadas a la industria biotecnológica, como la hidrólisis de glicósidos.

Los glicósidos son compuestos formados por un azúcar (generalmente un monosacárido) y un aglicón. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, particularmente en plantas, donde desempeñan numerosas funciones.

Los glicósidos de isoflavona o isoflavonoides, como la daidzina, genistina y glicitina, son compuestos fenólicos que se encuentran en frutas, verduras, té, vino tinto y soja (Esteves y Monteiro, 2001). El aglicón de estos compuestos, liberado como resultado de la actividad hidrolítica de las BGL, tiene una potente actividad biológica como agente antitumoral con varios usos en el campo de la medicina (Park *et al.*, 2001; Riedl *et al.*, 2005). Esto se debe a que solo si está libre la parte glucídica, el aglicón puede ser absorbido en el tracto intestinal humano. Otros glicósidos importantes son la floridzina cuyo aglicón es un precursor de la melanina. La genisteína, por su parte, que es el aglicón de la genistina, exhibe propiedades estrogénicas debido a su similitud estructural con la hormona femenina 17- $\beta$ -estradiol.

La presencia de BGL en el proceso de vinificación produce la liberación de compuestos responsables del aroma a partir de sus precursores glicosídicos (terpenos) entre los que se encuentran nerol, linalool, geraniol y citronelol (Gunata *et al.*, 1985). Cuando estos compuestos están glicosilados muestran baja volatilidad (Barbagallo *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2003; Spagna *et al.*, 2002).

Las antocianinas son pigmentos naturales que proporcionan el color azul, rojo, violeta y púrpura de muchas especies de plantas (Coutinho *et al.*, 2004). Algunas BGL pueden hidrolizar las antocianinas, liberando su aglicón (antocianidina) (Leite *et al.*, 2007), que tiene menor solubilidad y pigmentación. Esto permite su eliminación por precipitación y filtración, por lo que se puede usar para la despigmentación de zumos con altas

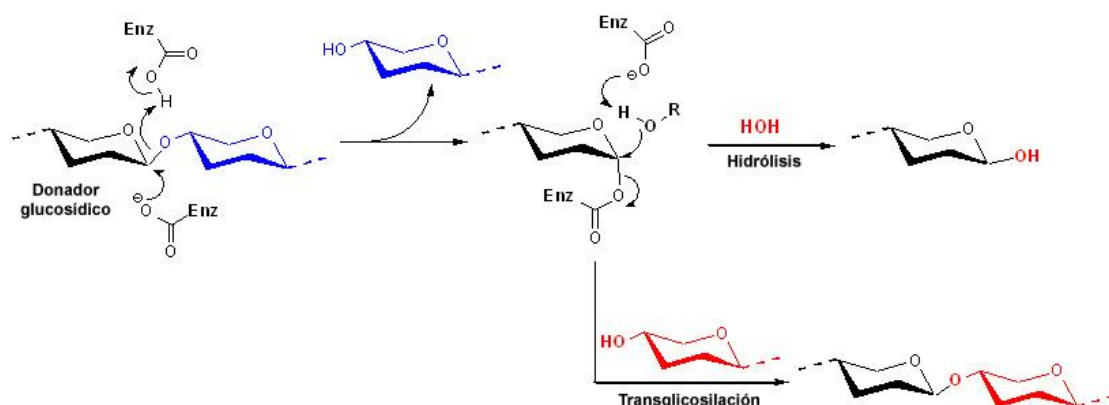
concentraciones en antocianinas o en el suavizado del color del vino tinto para obtener vino rosado (Palma-Fernandez *et al.*, 2002).

### 1.5.3.2. Actividad sintética: transglucosilación

En la naturaleza, las BGL catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, estas enzimas pueden catalizar la reacción inversa, es decir, la formación de uniones glicosídicas, catalizadas normalmente por las glicosil transferasas (EC 2.4).

La síntesis enzimática de alquilglicósidos y oligosacáridos a partir de hidratos de carbono o sus derivados alcoholes es interesante industrialmente porque el aislamiento de estos materiales a partir de fuentes naturales es una tarea compleja, ya que se encuentran a bajas concentraciones, resultando muy costoso obtenerlos. Además, la síntesis química es compleja y la estereoquímica de los oligosacáridos y sus derivados dificulta su purificación. En este contexto, la síntesis enzimática de estos compuestos es muy atractiva porque es regio- y estereoespecífica, minimizando el número de pasos de protección y desprotección de los intermediarios (Faber, 2004).

La transglucosilación (Figura 1.9) es una reacción controlada cinéticamente, es decir, la formación del glicósido depende del grado de ruptura del intermedio glicosil-enzima entre la reacción de hidrólisis y la de transferencia (Wang *et al.*, 2011). Para favorecer la transglucosilación se usa un donador glicosídico activado, principalmente aril-glicósidos (Andreotti *et al.*, 2006), que forma un compuesto intermedio que reacciona con un aceptor diferente del agua (generalmente alcoholes o azúcares) formándose un nuevo glicósido u oligosacárido.



**Figura 1.9.** Mecanismos de hidrólisis y síntesis enzimática de BGL. Adaptada de van Rantwijk *et al.* (1999).

El producto de transglicosilación puede, a su vez, ser sustrato de la enzima y ser hidrolizado, lo que reduce el rendimiento del glicósido por lo que se necesita un control estricto de los tiempos de reacción. Se han utilizado varias estrategias para mejorar el rendimiento del producto de interés: i) el uso de glicósidos donadores muy reactivos, de tal forma que se hidrolizan más rápido que el producto formado; ii) el uso de alta concentración de donador o aceptor; y iii) el uso de cosolventes orgánicos para reducir la actividad de agua ([van Rantwijk \*et al.\*, 1999](#); [Yoon y Ajisaka, 1996](#)). Los principales productos de las reacciones de transglicosilación son alquilglicósidos y oligosacáridos, cuyas características se detallan a continuación.

#### 1.5.3.2.1. Alquilglicósidos

Los alquilglicósidos tienen un gran potencial industrial como surfactantes no iónicos con una variedad de aplicaciones en productos alimenticios, detergentes, productos de limpieza, de cuidado personal, farmacéuticos y como químicos finos ([Das-Bradoo \*et al.\*, 2004](#)). Además también tienen actividad antimicrobiana y son agentes solubilizantes efectivos para proteínas de membranas celulares, particularmente hexil-, heptil- y octil-glicósidos. El butil-glicósido es también valioso porque sirve como precursor de surfactantes gemini y otros compuestos farmacéuticos. Por su parte, el metil-glicósido es precursor en la síntesis de metil-laminarioligosacáridos, compuestos útiles en la terapia anti SIDA ([Bhatia \*et al.\*, 2002](#)).

Estos compuestos se preparan a partir de fuentes renovables naturales como azúcares y alcoholes, y son biodegradados fácilmente ([Das-Bradoo \*et al.\*, 2004](#)).

#### 1.5.3.2.2. Oligosacáridos

Varios tipos de oligosacáridos, entre los se encuentran celooligosacáridos, galactooligosacáridos y xilooligosacáridos, se utilizan como prebióticos en la industria alimentaria. Por ejemplo, la lactulosa (un galactooligosacárido) se utiliza en fórmulas comerciales infantiles y varios productos lácteos, promoviendo la proliferación intestinal de bifidobacterias que crean un medio ácido que inhibe el crecimiento de bacterias indeseables ([Kim \*et al.\*, 2006](#)).

En medicina, se ha descrito su aplicación con propósitos terapéuticos ([Chitradon \*et al.\*, 2000](#)). Además cumplen diversas funciones en la señalización de varios procesos biológicos. También muchos compuestos tienen un rol importante en respuestas inmunológicas, infecciones virales y



bacterianas, regulación, diferenciación, desarrollo e inflamación (Flitsch, 2000).

La síntesis y modificación enzimática de estas moléculas es una de las áreas más intensamente explotadas en bioquímica (Kren y Thiem, 1997). La glicosilación es un método importante para la modificación estructural de compuestos con actividad biológica, obteniéndose en ciertos casos productos con mejoras en sus propiedades. Por ejemplo, aumento del poder edulcorante o conversión de compuestos lipofílicos en hidrofílicos que pueden mejorar las propiedades farmacodinámicas y la proliferación microbiana (Fernandez-Mayoralas, 1997). Algunas veces la unión de un azúcar a otra molécula, puede hacer que cambien sus propiedades, obteniéndose drogas originales y más efectivas (Kren y Thiem, 1997).

## 2. OBJETIVOS

---





Como se ha comentado previamente, la hidrólisis enzimática de la celulosa es un paso clave en la obtención de bioetanol 2G. Generalmente, los preparados comerciales empleados provienen de hongos del género *Trichoderma*, sin embargo, los niveles de BGL suelen ser insuficientes para una conversión completa de la celulosa, por lo tanto, es crucial encontrar alternativas a estos hongos. Este trabajo está centrado en el estudio de una especie fúngica aislada de material lignocelulósico, así como de las enzimas secretadas. Los objetivos planteados para la presente Tesis Doctoral se exponen brevemente a continuación:

- i) Identificar la especie fúngica aislada, atendiendo a sus características morfológicas y utilizando técnicas moleculares.
- ii) Analizar la capacidad del hongo para producir celulasas utilizando diferentes fuentes de carbono.
- iii) Purificar y caracterizar, desde un punto de vista bioquímico y molecular, las BGL secretadas por el hongo.
- iv) Emplear estas enzimas y/o el crudo enzimático del hongo en aplicaciones biotecnológicas.



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3.1.CEPAS DE MICROORGANISMOS

Las cepas fúngicas y bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la [Tabla 3.1](#).

**Tabla 3.1.** Microorganismos empleados en este trabajo.

Cepas fúngicas		Referencia
<i>Talaromyces amestolkiae</i> IJFM A795		Este trabajo
<i>Penicillium rubrum</i> CBS 263.93		(Yilmaz <i>et al.</i> , 2012)
<i>Penicillium purpurogenum</i> var. <i>rubrisclerotium</i> CBS 274.95		(Yilmaz <i>et al.</i> , 2012)
Cepa bacteriana	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	(Sambrook y Russell, 2001)

### 3.2.MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y se autoclavaron a 120 °C durante 20 min o a 110 °C durante 30 min si contenían glucosa.

#### 3.2.1. PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Para preparar este medio se disolvieron 39 g de agar de dextrosa y patata (BD Difco) en 1 L de agua destilada. Se utilizó para el mantenimiento y conservación de los hongos.

#### 3.2.2. CSS (*Corn Steep Solid*)

Se utilizó para la preparación del preinóculo de los hongos ([Tabla 3.2](#)).

**Tabla 3.2.** Medio CSS  
([Salvachúa \*et al.\*, 2011](#)).

Componente	g/L
FeSO $\cdot$ 7H $_2$ O	0,4
(NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$	9,0
HK $_2$ O $_4$ P	4,0
Glucosa	40,0
CSS	26,3
CaCO $_3$	7,0
	mL/L
Aceite de Soja	2,8

### 3.2.3. Mandels

Se utilizó para la producción de celulasas (Tabla 3.3). El pH se ajustó a 4,5 con HCl.

**Tabla 3.3.** Medio Mandels (Mandels y Weber, 1969).

Componente	g/L
Fuente de carbono	10,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,3
Urea	0,3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3
CaCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3
Peptona bacteriológica (BD Difco)	1,0
	<b>mg/L</b>
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5,0
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,6
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,4
	<b>mL</b>
Tween 80	2,0

### 3.2.4. Agar CYA (*Czapek Yeast Autolysate*)

Se utilizó para estudiar la morfología de las colonias de los hongos (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4.** Medio CYA (Pitt, 1979).

Componente	g/L
NaNO <sub>3</sub>	3,0
Extracto de levadura (BD Difco)	5,0
Sacarosa	30,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1,3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
Agar	7,5
	<b>mg/L</b>
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10,0
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10,0

### 3.2.5. Agar YES (*Yeast Extract Sucrose*)

Se utilizó para estudiar la morfología de las colonias de los hongos (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5.** Medio agar YES (Filtenborg *et al.*, 1990; Frisvad, 1981).

Componente	g/L
Extracto de Levadura (BD Difco)	20,0
Sacarosa	150,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
Agar	20,0
	<b>mg/L</b>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10,0

### 3.2.6. MEA (*Malt Extract Agar*)

Se utilizó para estudiar la morfología de las colonias de los hongos (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6.** Medio agar MEA (Raper y Thom, 1949).

Componente	g/L
Extracto de malta (BD Difco)	30,0
Peptona bacteriológica (BD Difco)	1,0
Glucosa	20,0
Agar	20,0
	<b>mg/L</b>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10,0



### 3.2.7. LB (*Luria-Bertani*)

Se utilizó para el mantenimiento y crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Tabla 3.7). El pH se ajustó a 7,0 con NaOH.

**Tabla 3.7.** Medio LB (Sambrook y Russell, 2001).

Componente	g/L
Tryptona (BD)	10,0
Extracto de Levadura (BD)	5,0
NaCl	10,0

Para el crecimiento y selección de transformantes resistentes a ampicilina, se incluyó este antibiótico en forma de sal sódica (Boehringer) a una concentración final de 100 mg/L. Para la selección blanco/azul de las colonias, se añadió 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal) a una concentración de 0,08 mM. El medio sólido se preparó añadiendo agar (15 g/L).

### 3.2.8. SOB (*Super Optimal Broth*)

Se utilizó para preparar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Tabla 3.8). El pH se ajustó a 7,0 con NaOH.

**Tabla 3.8.** Medio SOB (Hanahan, 1983).

Componente	g/L
Tryptona (BD)	20,0
Extracto de Levadura (BD)	5,0
NaCl	0,5
	mL/L
KCl 250 mM	10
MgCl <sub>2</sub> 2M	5

## 3.3.MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS

### 3.3.1. Mantenimiento de hongos

Para el mantenimiento de las cepas fúngicas se preparó medio PDA en tubos de agar inclinado. Se conservaron a 4 °C y se resembraron periódicamente, incubando a 28 °C. Para conservar las cepas durante tiempos prolongados se cubrieron con parafina y se guardaron a temperatura ambiente.

### 3.3.2. Cultivo de hongos

A partir de los tubos de agar inclinado y con la ayuda de un asa de siembra, el hongo se inoculó en placas Petri con medio PDA, cultivándolo a 28 °C durante 7 días. A partir de este cultivo se obtuvieron suspensiones de esporas. Para ello, se cortó una porción de agar de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se introdujo en 5 mL de una solución NaCl 1% (p/v) y Tween 80 al 0,1% (p/v). Se agitó y se tomaron 200 µL ( $2 \cdot 10^6$  esporas - conteo mediante cámara de Neubauer) para la preparación del preinóculo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio CSS. Éstos fueron incubados en un agitador orbital Innova 4330 (New Brunswick Scientifics) a 28 °C y 180 rpm durante 5 días. Para la producción de celulasas se inocularon 2 mL de este preinóculo por cada 50 mL de medio de cultivo.

### 3.3.3. Mantenimiento de bacterias

Para periodos de tiempo prolongados se conservaron alícuotas de *E. coli* DH5α a -80 °C. Para ello se realizaron cultivos líquidos de LB inoculados con una colonia aislada. Tras su incubación (16 h, 100 rpm, 37 °C) se mezclaron 850 µL con 250 µL de una solución autoclavada de glicerol al 85% (v/v). Finalmente la mezcla se congeló con nitrógeno líquido para su conservación a largo plazo.

### 3.3.4. Cultivo de bacterias

Las bacterias *E. coli* DH5α se cultivaron en medio LB líquido o sólido, con ampicilina cuando fuera necesario, a 37 °C durante 16 h. Se utilizaron tubos de plástico de 13 mL con 2 mL de medio para cultivar en medio líquido, agitándolos en incubador orbital a 180 rpm. Para los cultivos en medio sólido se utilizaron placas Petri de 90 mm de diámetro con 30 mL de medio.

## 3.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS CEPAS FÚNGICAS

### 3.4.1. Análisis macroscópico

Se estudiaron las características macroscópicas de las cepas *T. amestolkiae* IJFM A795, *P. rubrum* CBS 263.93 y *P. purpurogenum* var. *rubrisclerotium* CBS 274.95 (las dos últimas procedentes de la colección del *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, CBS, Holanda). Para ello, se sembraron en placas que contenían diferentes medios de cultivo (CYA, YES y MEA) depositando 200 µL de las suspensiones de esporas (Apartado 3.3.2) en tres puntos equidistantes, y se incubaron durante 7 días a 26-28 °C en oscuridad.

### 3.4.2. Análisis microscópico

Para el análisis microscópico, se realizaron fermentaciones en estado sólido con las distintas cepas fúngicas a comparar, utilizando matraces Erlenmeyer de 100 mL con 2 g de paja de trigo triturada autoclavados a 120 °C. Estos matraces se inocularon con 2 mL de los distintos preinóculos en medio CSS y se incubaron durante 7 días a 26-28 °C.

Muestras de los cultivos se fijaron con glutaraldehído 5 mM, durante 12 h a 4 °C. El exceso de glutaraldehído se eliminó lavando con agua destilada, y después las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (25, 50, 75 y 100%), en sucesivas etapas de 15 min cada una. Las muestras se colocaron en portamuestras formados por pequeños tacos de aluminio, se secaron en condiciones de bajo vacío, se recubrieron con oro con la ayuda de un pulverizador catódico Sputter coater SC510 (Bio-Rad) y se observaron al microscopio en condiciones de alto vacío.

El estudio microscópico se llevó a cabo utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, *Scanning Electron Microscope*) en el Museo de Ciencias Naturales de Madrid. Este equipo (FEI INSPECT), tiene un detector de electrones secundarios retrodispersados y dispone de un sistema de análisis integrado Oxford Instruments Analytical-INCA y de un detector de catodoluminiscencia (Gatan Mono CL3), refrigerado con nitrógeno líquido y ampliación espectral hasta el infrarrojo.

## 3.5.DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Los ensayos espectrofotométricos que se describen en los siguientes apartados, si no se indica lo contrario, se llevaron a cabo en un equipo Shimadzu UV-160A a temperatura ambiente.

### 3.5.1. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de [Bradford \(1976\)](#), usando el reactivo Bio-Rad *protein assay*, una solución ácida del colorante azul brillante Coomassie G-250. Las muestras (hasta 800 µL) se mezclaron con 200 µL del reactivo y se incubaron 5 min a temperatura ambiente, siguiendo las instrucciones del proveedor. A continuación se valoró su absorbancia a 595 nm y se interpoló en una recta de calibrado elaborada con albúmina de suero bovino (BSA).

### 3.5.2. Cuantificación de sustancias reductoras

La concentración de sustancias reductoras se determinó mediante el método [Somogyi y Nelson \(1945\)](#). La muestra (hasta 200 µL) se incubó con 200

$\mu\text{L}$  de una solución de Somogyi I – Somogyi II (4:1) (Tablas 2.9 y 2.10) a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (15 min). A continuación, se atemperó para mezclarse con  $200\text{ }\mu\text{L}$  de reactivo de Nelson (Tabla 3.11) y agua destilada ( $2,4\text{ mL}$ ) y se agitó en un vórtex. Finalmente, se midió la absorbancia a  $540\text{ nm}$  y se convirtió en equivalentes de glucosa utilizando una recta de calibrado con este azúcar.

**Tabla 3.9.** Solución Somogyi I.

Componente	g/L
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	180
$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	30
$\text{NaHCO}_3$	20

**Tabla 3.10.** Solución Somogyi II.

Componente	g/L
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	180
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	20

**Tabla 3.11.** Reactivo de Nelson.

Componente	g/L
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50
	mL/L
$\text{H}_2\text{SO}_4$ 98% (p/p)	42
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12% (p/v)	50

### 3.5.3. Cuantificación de glucosa

La cantidad de glucosa se determinó mediante el método de la glucosa oxidasa - peroxidasa (Trinder, 1969), utilizando el kit comercial Glucose-TR (Spinreact), según las instrucciones del fabricante.

### 3.5.4. Determinación del pH

El pH se valoró con un pH-metro Basic 20 calibrado con soluciones estándar de pH 4,0 y 7,0. El electrodo Liq-Glass (Hamilton) se utilizó para medir el pH de soluciones y cultivos, mientras que para medir el gradiente de pH en geles de isoelectroenfoque se utilizó un electrodo de superficie 52-07 (Apartado 3.9.5). Todo el material utilizado fue de CRISON, a menos que se indique lo contrario.

### 3.5.5. Valoraciones enzimáticas de celulasas

Los métodos espectrofotométricos que se exponen a continuación se utilizaron para caracterizar diferentes actividades enzimáticas presentes en los medios de cultivo. En todos los casos se realizaron controles negativos

de los reactivos y las enzimas y éstos se restaron a los problemas para calcular las actividades enzimáticas.

Las reacciones que se hicieron a temperatura controlada se llevaron a cabo en un termobloque Thermo Shaker TS-100 Biosan, en agitación continua (1.200 rpm). Todas las valoraciones se hicieron por triplicado.

#### **3.5.5.1. Actividad celulasa global (avicelasa)**

La actividad celulasa global hace referencia a la acción sinérgica de las tres enzimas del complejo celulolítico. Se trata de una medida indirecta de la actividad CBH, en la que se utiliza celulosa microcristalina (Avicel, Sigma) como sustrato, por lo que también se denomina avicelasa (Avi). La actividad se determinó a 50 °C, usando una solución de Avicel 1,25% (p/v) en tampón citrato sódico 60 mM, pH 5. Para ello, se añadieron 0,8 mL de sustrato y 0,2 mL de la enzima, convenientemente diluida, y se incubaron diferentes tiempos (5, 10 y 15 min) hasta conseguir valores lineales de actividad. La reacción se detuvo introduciendo las muestras en hielo y, tras dejar decantar el Avicel en suspensión, se determinaron las sustancias reductoras liberadas mediante el método de Somogyi-Nelson ([Apartado 3.5.2](#)). Una unidad de actividad Avi se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de equivalentes de glucosa por minuto.

#### **3.5.5.2. Actividad endoglucanasa**

La actividad endoglucanasa (EG) se determinó utilizando carboximetilcelulosa sódica de media viscosidad (CMC, Sigma) como sustrato. La presencia de los grupos metilo y el alto grado de polimerización de la CMC hacen que se le considere un sustrato similar a la celulosa amorfa, adecuado para determinar la actividad EG.

La actividad se valoró a 50 °C, usando una solución de CMC 2,2% (p/v) en tampón citrato sódico 50 mM, pH 5. Para ello, se añadieron 0,9 mL de sustrato y 0,1 mL de la enzima, convenientemente diluida, y se incubaron diferentes tiempos (5, 10 y 15 min) hasta conseguir valores lineales de actividad. La reacción se detuvo introduciendo las muestras en hielo y se determinaron las sustancias reductoras liberadas mediante el método de Somogyi-Nelson ([Apartado 3.5.2](#)). Al añadir el reactivo de Nelson se genera un precipitado, por lo que fue necesario centrifugar (5 min a 14.000  $\times$  g) antes de determinar la absorbancia del sobrenadante a 540 nm. Una unidad de actividad EG se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de equivalentes de glucosa por minuto.

### 3.5.5.3. Actividad $\beta$ -glucosidasa

La actividad  $\beta$ -glucosidasa (BGL) se determinó usando el sustrato sintético *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (*p*NPG, Sigma), que posee una estructura y un enlace intramolecular similar a la celobiosa. En la reacción se libera *p*-nitrofenol (*p*NP).

La actividad se valoró a 50 °C, usando una solución de *p*NPG 0,2% (p/v) en tampón citrato sódico 100 mM, pH 5. Para ello, se añadieron 0,1 mL de sustrato y 0,1 mL de la enzima, convenientemente diluida, y se incubaron durante 10 min. La reacción se detuvo añadiendo 0,5 mL de carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 2% (p/v) y la liberación de *p*NP se midió a 410 nm ( $\epsilon_{410} = 15,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Una unidad de actividad BGL se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*NP por minuto.

### 3.6.PRODUCCIÓN DE CELULASAS

Los hongos se cultivaron durante 10 días en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio Mandels con Avicel, como fuente de carbono, en un agitador orbital Innova 4330 (New Brunswick Scientifics) a 28 °C y 180 rpm.

Para tratar de optimizar la producción de celulasas en *T. amestolkiae* IJFM A795 se sustituyó el Avicel por distintas fuentes de carbono de naturaleza celulósica como posibles inductores de estas enzimas: paja de trigo (Abengoa Bioenergía, Teixeiro - La Coruña), salvado de trigo (Hacendado), salvado de avena (Hacendado) y *slurry* ácido de paja de trigo (Abengoa Bioenergía, Babilafuente - Salamanca). En todos los casos, los experimentos se realizaron por triplicado.

Con el objetivo de escalar la producción en *T. amestolkiae* IJFM A795, se cultivó en matraces Erlenmeyer de 1 L con 100 mL de medio Mandels con Avicel, en las condiciones descritas anteriormente, y en un fermentador Microferm MF 114 (New Brunswick Scientifics) con un vaso de 1,5 L de capacidad y 1,3 L de medio Mandels con Avicel, que contenía 500  $\mu\text{L}$  de antiespumante (Antifoam 204, Sigma). Durante la fermentación se controlaron la temperatura (28 °C), la aireación (1-1,5 L/min) y la agitación (600 rpm).

En todos los casos se tomaron muestras periódicamente. El micelio se separó del medio líquido por centrifugación a  $13.000 \times g$  durante 10 min y las actividades enzimáticas se determinaron en el sobrenadante.

### 3.7. TÉCNICAS DE ULTRAFILTRACIÓN

Los cultivos se centrifugaron a  $10.000 \times g$  durante 30 min, para separar el micelio del líquido de cultivo. El sobrenadante, en caso de que fuera necesario, se filtró a vacío a través de papel de filtro y/o discos de membrana de nitrocelulosa (Millipore) de 0,8, 0,45 y/o 0,22  $\mu\text{m}$  para completar su clarificación.

Para obtener el crudo enzimático los sobrenadantes filtrados se concentraron y dializaron por ultrafiltración. Esta técnica también se utilizó para concentrar y dializar las muestras antes o después de las distintas etapas cromatográficas de purificación. Los equipos empleados se describen a continuación.

#### 3.7.1. Ultrafiltración tangencial

Para volúmenes superiores a 1 L se utilizó una bomba peristáltica (7518-02, Masterflex) y un equipo de ultrafiltración con una membrana de polisulfona con un corte molecular de 10 kDa (Membrane Cassette, Filtron).

#### 3.7.2. Ultrafiltración bajo presión

Para volúmenes entre 20-250 mL se usó una célula de ultrafiltración (Amicon, Millipore) con una membrana de polisulfona con un corte molecular de 10 kDa (Millipore). El proceso se llevó a cabo con agitación suave utilizando nitrógeno gaseoso para ejercer presión (2 bar).

#### 3.7.3. Ultrafiltración por centrifugación

Para volúmenes máximos de 15 mL se emplearon diferentes dispositivos de ultrafiltración (Millipore): Macrosep (15 mL), Microsep (3 mL) y Nanosep (0,6 mL), con una membrana de celulosa regenerada y con un corte molecular de 3 kDa. La centrifugación se realizó a  $5.000 \times g$  a 4 °C.

### 3.8. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

#### 3.8.1. Purificación de las BGL de *T. amestolkiae*

Todas las separaciones cromatográficas utilizadas para purificar las BGL de *T. amestolkiae* IJFM A795 se realizaron en un sistema HPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare). A continuación se detallan las técnicas empleadas.



### 3.8.1.1. Intercambio aniónico

Como primer paso de purificación se empleó un cartucho HiTrap Capto Adhere (5 mL, GE Healthcare) que tiene una matriz con carga positiva. La carga de la proteína depende del pH de la fase móvil, en este caso se utilizó tampón fosfato sódico 10 mM pH 6 para equilibrar el cartucho y para formar el gradiente salino con NaCl. Una vez equilibrada la columna se aplicó el crudo enzimático obtenido por ultrafiltración y dializado frente al mismo tampón. El flujo aplicado fue de 1 mL/min. Después de eluir las proteínas no retenidas durante 10 min, se aplicó un gradiente de NaCl (0 – 0,5 M) durante 70 min. A continuación se lavó el cartucho con NaCl 1 M durante 20 min y se dejó reequilibrar hasta las condiciones iniciales. Se midieron las actividades enzimáticas y la absorbancia a 280 nm en el detector ultravioleta para estimar la concentración de proteínas en las fracciones eluidas.

También se utilizaron como pasos posteriores de purificación columnas de intercambio aniónico de alta presión:

a) Columna Resource Q (6 mL, GE Healthcare), equilibrada con tampón fosfato sódico 10 mM pH 6. El flujo aplicado fue de 1,7 mL/min. Después de eluir las proteínas no retenidas durante 9 min, se aplicó un gradiente lineal de NaCl (0 – 0,14 M) durante 25 min. A continuación se lavó el cartucho con NaCl 1 M durante 7 min y se dejó reequilibrar hasta las condiciones iniciales. Este paso se utilizó para purificar BGL-1.

b) Columna Mono Q 5/50 (1 mL, GE Healthcare), equilibrada con tampón fosfato sódico 10 mM pH 6. El flujo aplicado fue de 0,8 mL/min. Después de eluir las proteínas no retenidas, a los 5 min, se aplicó un gradiente de NaCl lineal (0 – 0,25 M) durante 47 min. A continuación se lavó el cartucho con NaCl 1 M durante 7 min y se dejó reequilibrar hasta las condiciones iniciales. Este paso se utilizó para purificar BGL-3.

### 3.8.1.2. Exclusión molecular

Con esta técnica cromatográfica las proteínas se separan en base a su tamaño molecular, eluyendo primero las proteínas de mayor tamaño a través de las esferas porosas que constituyen la matriz de la columna. En este caso se utilizó la columna Superdex 75 HR 10/30 (GE Healthcare), que se equilibró con fosfato sódico 10 mM pH 6 y NaCl 100 mM para evitar uniones inespecíficas a la columna. El flujo aplicado fue de 0,3 mL/min. Se midió la actividad y la concentración de proteínas en todos los picos detectados a 280 nm. Este paso se utilizó como tercera etapa de purificación para la enzima BGL-2.



Esta técnica sirvió también para analizar el estado de oligomerización de las tres BGL purificadas. Para ello, se usó la columna Superose 12 HR 10/30, que se equilibró en el mismo tampón que en el caso anterior utilizando un flujo de 0,5 mL/min.

### 3.8.2. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó sobre placas POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel) usando como fase móvil 1-butanol/ácido acético/agua (2:1:1, v/v). Una vez depositadas las muestras y los patrones sobre la placa (10-50 µL), ésta se introdujo en la cubeta con la fase móvil y se dejó correr hasta que el frente del disolvente alcanzó el final de la placa. Luego, se secó la placa y se repitió el proceso para una mejor separación de los oligosacáridos. Terminado el proceso se secó la placa y se sumergió en la solución reveladora MeOH/ácido sulfúrico (95:5, v/v). Por último, se secó en una estufa a 110 °C durante 10 min para el revelado de bandas. Como patrón se usó una mezcla de celooligosacáridos (1-6 unidades de glucosa, Megazyme) a una concentración de 0,5 mg/mL cada uno.

### 3.8.3. Cromatografía de gases / espectrometría de masas

El análisis de los alquilglicósidos formados por transglicosilación ([Apartado 3.9.10](#)) se realizó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM). A cada muestra se añadieron 100 µg de mio-inositol como patrón interno, secando a continuación en un rotavapor. Las muestras se derivatizaron resuspendiéndolas en 250 µL de una solución de cloruro de hidroxilamina en piridina 2,5% (p/v), para formar las oximas de los azúcares, manteniéndolas a 70 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 150 µL del agente sililante, bis-trimetilsilil trifluoroacetamida (BSTFA), para formar los derivados sililados, y se mantuvieron a 80 °C durante 10 min ([Rojas-Escudero et al., 2004](#)).

El análisis se realizó en un instrumento Agilent 7980A-5975C utilizando una columna HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,2 µm) y un programa de temperaturas que comienza a 180 °C, seguido de una rampa de 2 °C min<sup>-1</sup> hasta 280 °C (1 min).

## 3.9. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 3.9.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Las electroforesis en geles verticales de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se realizaron en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel*

*Electrophoresis*, SDS-PAGE), según el método de Laemmli (1970) y utilizando el sistema Mini Protean III Cell. La composición de los geles de separación y de concentración se indica en las Tablas 2.12 y 2.13, respectivamente. El potencial aplicado para separar las proteínas fue de 120 V, hasta que las muestras atravesaron el gel de concentración, y de 200 V durante el resto de la electroforesis. Las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente, utilizando los tampones que se describen en las Tablas 2.14 y 2.15. Todos los productos utilizados fueron de Bio-Rad, a menos que se indique lo contrario.

**Tabla 3.12.** Gel de separación para SDS-PAGE al 12% (p/v).

Componente	mL
Acrilamida/bis-acrilamida 29,2:0,8	4,0
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5
SDS 10% (p/v)	0,1
Persulfato amónico 10% (p/v)	0,05
TEMED	0,005
H <sub>2</sub> O	3,3

**Tabla 3.13.** Gel de concentración para SDS-PAGE.

Componente	mL
Acrilamida/bis-acrilamida 29,2:0,8	0,66
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25
SDS 10% (p/v)	0,05
Persulfato amónico 10% (p/v)	0,025
TEMED	0,005
H <sub>2</sub> O	2,9

**Tabla 3.14.** Tampón de carrera 1x para SDS-PAGE.

Componente	g/L
Glicina	14,4
Tris-base	3,0
SDS	1,0
Ajustar pH a 8,3-8,6.	

**Tabla 3.15.** Tampón de muestra para SDS-PAGE.

Componente	mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1,2
Glicerol	1,0
SDS 10% (p/v)	2
$\beta$ -mercaptoetanol	0,5
Azul de bromofenol 1% (p/v)	0,5
H <sub>2</sub> O	4,8

Agregar 5  $\mu$ L de esta mezcla a las muestras (volumen final de carga 15-20  $\mu$ L) e incubar durante 5 min a 95 °C para desnaturalizar.

Tras la electroforesis, las proteínas se visualizaron mediante tinción con una solución del colorante Coomassie R-250 al 0,1% (p/v) en metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Posteriormente, el gel se lavó sucesivas veces en una solución acuosa de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v), con agitación suave, hasta visualizar las bandas de proteínas. Como marcadores de peso molecular se usaron los marcadores preteñidos *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (10-250 kDa).

### 3.9.2. Determinación de la masa molecular de las proteínas

La masa molecular de las enzimas purificadas se determinó con un espectrómetro de masas de MALDI-TOF/TOF Autoflex III (Bruker Daltonics) equipado con un láser Smartbeam. La adquisición de los espectros se realizó con el software FlexControl (Bruker Daltonics) usando una potencia de láser justo por encima del umbral de ionización operando en modo positivo lineal. De rutina, se sumaron 1.000 disparos de láser en un único espectro de masas. La calibración externa se realizó con BSA (Sigma), que cubre el rango de 30.000 a 150.000 Da. Como matriz se utilizó 2,5-dihidroxiacetofenona (Bruker Daltonics), que se preparó disolviendo 7,6 mg de este compuesto en 375  $\mu$ L de etanol (Merck) a los que se añadieron 125  $\mu$ L de citrato diamónico 80 mM.

Para la preparación de la muestra, se mezclaron 2  $\mu$ L de la proteína purificada con 2  $\mu$ L de TFA (ácido trifluoroacético, Sigma) y 2  $\mu$ L de la disolución de la matriz. Se depositó 1  $\mu$ L de esta mezcla en el portamuestras del espectrómetro, que consiste en una placa de acero inoxidable AnchorChip MTP-384 800  $\mu$ m (Bruker Daltonics), y se dejó cristalizar a temperatura ambiente. El análisis de los espectros se realizó con el software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

### 3.9.3. Tinción de glicoproteínas

Para saber si las BGL de *T. amestolkiae* IJFM A795 eran glicoproteínas se utilizó el método de tinción PAS (*Periodic Acid-Schiff*) usando el reactivo de Schiff (Sigma). Se realizaron SDS-PAGE según se describe en el [Apartado 3.9.1](#). Para fijar las bandas del gel, éste se sumergió durante 30 min en una solución acuosa de etanol 40% (v/v) y ácido acético 7% (v/v). Se lavó 4 veces durante 30 min con la solución fijadora y se dejó en ella durante 16 h. Después de esto, se lavó el gel dos veces más con una solución fijadora durante 30 min. Posteriormente se sumergió el gel en una solución acuosa de ácido peryódico 1% (v/v) y ácido acético 3% (v/v), durante 60 min, para oxidar las glicoproteínas, y se lavó diez veces con agua. Finalmente, el gel se reveló sumergiéndolo en el reactivo de Schiff en oscuridad. Las glicoproteínas exhiben bandas visibles de color rojo-púrpura en 20 min aproximadamente.

### 3.9.4. Desglicosilación

En las reacciones de desglicosilación enzimática se utilizaron diferentes enzimas comerciales: i) endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H (endo-H, Roche) y N-glicosidasa F (PNGasa F, Sigma) para hidrolizar los azúcares unidos por enlaces N-glicosídicos. Estas enzimas hidrolizan el enlace entre dos restos de N-acetilglucosamina unidos a una asparagina de la proteína o entre la primera N-acetilglucosamina y la asparagina; y ii) O-glicosidasa (Roche), que hidrolizan exclusivamente enlaces O-glicosídicos entre los residuos de serina o treonina de la proteína y la N-acetilglucosamina.

En todos los casos, las glicoproteínas se tamponaron al pH óptimo correspondiente a cada glicosidasa y se desnaturalizaron en una solución que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M y SDS 0,1% (p/v), incubándolas durante 5 min a 100 °C. Después se enfrió la solución y se procedió a los tratamientos con cada una de las glicosidasas mencionadas anteriormente. Como control, cada muestra se sometió al mismo procedimiento sin la adición de glicosidasa. El resultado se analizó mediante SDS-PAGE ([Apartado 3.9.1](#)) previa inactivación de la glicosidasa incubando la mezcla durante 5 min a 100 °C. A continuación se detallan las reacciones para la desglicosilación de las enzimas de *T. amestolkiae* IJFM A795, utilizando las diferentes glicosidasas.

#### 3.9.4.1. Endo-H

Las muestras se dializaron en tampón fosfato sódico 10 mM pH 6. Se añadieron 0,6  $\mu$ g de glicoproteína a la solución desnaturalizante en un

volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Tras la desnaturalización se añadieron 2 mU de endo-H y la mezcla se incubó a 37 °C durante 16 h.

### 3.9.4.2. PNGasa F

Las muestras se dializaron en tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,5. Se añadieron 0,8  $\mu\text{g}$  de glicoproteína a la solución desnaturalizante en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Tras la desnaturalización se añadieron 2,5 mU de PNGasa F y la mezcla se incubó a 37 °C durante 16 h.

### 3.9.4.3. O-glicosidasa

Las muestras se dializaron en tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,5. Se añadieron 0,6  $\mu\text{g}$  de glicoproteína a la solución desnaturalizante en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Tras la desnaturalización se añadieron 0,5 mU de O-glicosidasa y la mezcla se incubó a 37 °C durante 16 h.

## 3.9.5. Isoelectroenfoque

El punto isoeléctrico (pI) de las BGL purificadas se determinó por isoelectroenfoque (IEF) en geles de poliacrilamida al 5% (p/v), cuya composición se muestra en la [Tabla 3.16](#), utilizando el sistema Mini Protean III Cell (Bio-Rad). Las soluciones del ánodo y del cátodo fueron  $\text{H}_3\text{PO}_4$  7 mM y NaOH 50 mM, respectivamente.

**Tabla 3.16.** Gel de IEF.

Componente	mL
Acrilamida/bis-acrilamida 29,2:0,8	1,87
Anfolitos (85% de rango de pH 2,5-5 y 15% de 3-10; <i>GE Healthcare</i> )	0,57
Persulfato amónico 10% (p/v)	0,038
TEMED	0,004
$\text{H}_2\text{O}$	4,95

A cada pocillo del gel se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de una solución de azul de bromofenol 1 mg/mL en glicerol 50% (v/v). Las muestras (20-40 mU) se mezclaron en una proporción 1:1 con glicerol 50% (v/v) en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  y se depositaron en los pocillos. El programa constaba de tres etapas: 100 V durante 1 h, 250 V durante 1 h y 500 V durante 30 min. Tras realizar el isoelectroenfoque, se midió el gradiente lineal de pH formado en el gel con un electrodo de superficie ([Apartado 3.5.4](#)).

El revelado de las bandas se hizo mediante zimograma. Para ello, se sumergió el gel en una solución 2 mM de 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-

glucopiranosido (4-MUG, Sigma) durante 1 min, manteniendo una agitación suave, y se reveló en un transiluminador UV Gel Doc XR (Bio-Rad). El valor de pI de las BGL se calculó por interpolación sobre la recta de calibrado obtenida. Esta técnica también se usó para detectar posibles isoformas de BGL en el crudo de *T. amestolkiae* IJFM A795.

### 3.9.6. Huella peptídica

La identificación de las proteínas se llevó a cabo mediante el análisis de su huella peptídica siguiendo los pasos que se describen a continuación. Todos los equipos y productos utilizados son de Bio-Rad, a menos que se indique lo contrario.

Las enzimas purificadas se analizaron por SDS-PAGE ([Apartado 3.9.1](#)) en un gel de poliacrilamida 10% (p/v), el cual se tiñó con SYPRO Ruby, según las instrucciones del fabricante: después de la electroforesis se colocó el gel en un recipiente con 100 mL de solución fijadora (MeOH 50% (v/v) y ácido acético 7% (v/v)) y se agitó suavemente durante 30 min. Este proceso se repitió, desechando la solución. Luego se añadieron 60 mL de SYPRO Ruby y se dejó agitando durante 16 h, tras lo cual se lavó el gel, durante 30 min, con 100 mL de MeOH 10% (v/v) y ácido acético 7% (v/v). Por último, con el objeto de prevenir daños en el gel, se lavó dos veces con agua Milli-Q durante 5 min.

Una vez teñido el gel, se procedió al marcaje y picado de las bandas en el picador automático ExQuest Spot Cutter, utilizando el software PDQuest Advanced-8.0.1. Los puntos picados se digirieron en base al método descrito por [Shevchenko y cols. \(1996\)](#), con ligeras modificaciones. Las muestras se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM (99,5% de pureza, Sigma) y posteriormente con acetonitrilo (ACN, Scharlau). Después se llevó a cabo la reducción, con ditioneitol (DTT) 10 mM en bicarbonato amónico 50 mM (30 min), y la alquilación, con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM (20 min). Transcurrido ese tiempo, se lavaron las muestras con bicarbonato amónico 50 mM y ACN y se añadió una solución de tripsina porcina modificada (Sigma) a una concentración final de 12,5 ng/μL en bicarbonato amónico 50 mM. Las proteínas presentes se digirieron durante 8 h a 37 °C.

Los péptidos obtenidos tras la digestión con tripsina se extrajeron añadiendo ACN y TFA 0,5% (v/v, Sigma), se secaron a vacío y se resuspendieron en 4 μL de ACN 20% (v/v) y TFA 0,1% (v/v). A 1 μL del digerido triptico se añadió 1 μL de la matriz compuesta por 5 mg/mL de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en ACN 33% (v/v) y TFA 0,25% (v/v).



Se depositó 1  $\mu\text{L}$  de esta mezcla en el portamuestras del espectrómetro de masas (Apartado 3.9.2) y se dejó secar a temperatura ambiente.

Los datos de MALDI-MS y MALDI-MS/MS se obtuvieron de forma automática en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF Autoflex III (Bruker Daltonics) equipado con un láser Smartbeam y un dispositivo LIFT-MS/MS (Adams y Gallagher, 2001). Los espectros de masas se midieron en modo reflector a una frecuencia de láser de nitrógeno de 50 Hz, con un voltaje de aceleración iónica de 25 kV, un tiempo de retardo de 140 ns, acumulándose 1.000 espectros individuales para la huella peptídica y 2.000 para MS/MS. El análisis de los datos de masas se llevó a cabo con el software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). Para obtener una mayor exactitud, los espectros MALDI-TOF/TOF se calibraron internamente empleando como referencia dos iones procedentes de la autólisis de la tripsina con una relación masa-carga ( $m/z$ ) de 842,510 y 221,105, respectivamente, lo que garantiza un error menor a 50 ppm en la masas peptídicas detectadas. La calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realizó con los espectros de los iones fragmento de las señales protonadas de una mezcla de péptidos que cubre el intervalo  $m/z = 800\text{-}3.200$  Da.

Los datos obtenidos se combinaron mediante el software BioTools 3.0 (Bruker Daltonics) y se eliminaron los valores de masas procedentes de tripsina, queratinas, matriz o los aductos de sodio. El análisis de los datos se realizó frente a la base de datos NCBIInr (*National Center for Biotechnology Information non-redundant*) mediante el motor de búsqueda MASCOT 2.3 (Matrix Science) (Perkins *et al.*, 1999). Otros parámetros fijados para la búsqueda fueron los siguientes: enzima, carbamidometilación de las cisteínas (como modificación fija), oxidación de metionina (como modificación variable), tolerancia para péptidos (20 ppm) y tolerancia para fragmentos (0,5 Da). Se consideró significativa la identificación de proteína, en NCBIInr, cuando el *score* fue superior a 75 ( $p < 0,05$ ). Tanto los espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS, como los resultados de la búsqueda en la base de datos fueron revisados manualmente en detalle.

### 3.9.7. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de las BGL

#### 3.9.7.1. pH óptimo

Se analizó el pH óptimo de BGL-1, BGL-2 y BGL-3 tras establecer ensayos de actividad enzimática en las condiciones estándar de reacción (Apartado 3.5.5.3) pero a distintos pH. Para cubrir un mayor rango de pH, los tampones utilizados fueron citrato sódico pH 3,0-6,0 y fosfato sódico

pH 6,0-8,0, solapando los valores coincidentes como referencia, en ambos casos a una concentración de 100 mM.

### 3.9.7.2. Estabilidad frente a pH

Para determinar la estabilidad frente al pH se incubaron cada una de las enzimas purificadas durante 24 h a temperatura ambiente en los tampones indicados en el apartado anterior. Trascurrido ese tiempo se llevó a cabo la reacción enzimática con el sustrato siguiendo las condiciones estándar descritas en el [Apartado 3.5.5.3](#).

### 3.9.7.3. Temperatura óptima

La temperatura óptima se determinó siguiendo la reacción de cada enzima, con el sustrato apropiado, en un rango de temperaturas entre 30 y 80 °C en las condiciones estándar descritas en el [Apartado 3.5.5.3](#).

### 3.9.7.4. Estabilidad frente a temperatura

Las enzimas purificadas se incubaron en un rango de temperaturas entre 30 y 60 °C, durante 24 h, en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 4,0. Tras este tiempo, la actividad de la enzima a las diferentes temperaturas se determinó en las condiciones estándar descritas en el [Apartados 3.5.5.3](#).

## 3.9.8. Estudios de especificidad

Las BGL purificadas se ensayaron frente a:

- Aril-glicósidos (10 mM): *p*NPG, *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido, *p*-nitrofenil- $\beta$ -L-fucopiranosido y *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido.
- Celooligosacáridos (10 mM): celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y celohexaosa.
- Polisacáridos (1%, p/v): Avicel, CMC, xilano, laminarina y almidón.

El nitrofenol liberado se determinó en las condiciones estándar descritas en el [Apartado 3.5.5.3](#). Las actividades sobre oligo- y polisacáridos se midieron usando el método de Somogyi-Nelson ([Apartado 3.5.2](#)) y se confirmaron cuantificando la glucosa liberada como se indica en el [Apartado 3.5.3](#).



### 3.9.8.1. Constantes cinéticas y estudios de inhibición

Las constantes cinéticas de las BGL purificadas se determinaron incubando las enzimas a sus pH y temperaturas óptimos. Las reacciones se realizaron en tampón citrato sódico 100 mM pH 4,0, a 50 °C para la enzima BGL-1 de *T. amestolkiae* y a 60 °C para BGL-2 y BGL-3, con *p*NPG (0,08-5 mM) y celobiosa (0,08-10 mM). Para los experimentos de inhibición de las BGL se usó *p*NPG como sustrato, en presencia de diferentes concentraciones de glucosa (0-10 mM) y  $\delta$ -gluconolactona ( $\delta$ -Gl, 0-5 mM).

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo siguiendo las condiciones estándar descritas en el [Apartado 3.5.5.3](#), utilizando entre 20-40  $\mu$ g de enzima purificada. Los valores de  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  y  $K_i$  se determinaron utilizando el método de [Lineweaver-Burk \(1934\)](#). En el cálculo de  $k_{cat}$  se utilizó el valor de masa molecular de la proteína obtenida mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF ([Apartado 3.9.2](#)) multiplicado por su grado de oligomerización.

### 3.9.9. Efecto de varios compuestos sobre la actividad BGL

Se evaluó el efecto de diferentes compuestos sobre la actividad BGL:

- Monosacáridos (1 mg/mL): glucosa, arabinosa, xilosa, galactosa, fructosa y manosa.
- Cationes metálicos de las siguientes sales (5 mM):  $MgSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $NiSO_4$ ,  $FeCl_3$ ,  $MnCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $HgCl_2$ ,  $BaCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $KCl$ ,  $LiCl$ ,  $Pb(NO_3)_2$  y  $AgNO_3$ .
- Agentes caotrópicos (0,1% (p/v)):  $\beta$ -mercaptoetanol, Triton X-100, EDTA, SDS, DTT, Tween 80 y L-cisteína.
- Alcoholes alifáticos (10-40% (v/v)): metanol (MeOH), etanol (EtOH), 1-propanol (PrOH) y 1-butanol (BuOH).

La actividad residual se determinó utilizando *p*NPG en las condiciones estándar descritas en el [Apartado 3.5.5.3](#), después de incubar la enzima purificada durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de los compuestos mencionados.

### 3.9.10. Reacciones de transglicosilación

#### 3.9.10.1. Síntesis de alquilglicósidos

Las reacciones de transglicosilación para formar metil-, etil-, propil- y butilglucósido contenían, en un volumen final de 500  $\mu$ L, tampón citrato

sódico 100 mM pH 5, 0,6 U/mL de BGL-1, BGL-2 o BGL-3 de *T. amestolkiae* IJFM A795, *p*NPG 6 mM como donador glicosídico y MeOH, EtOH, PrOH o BuOH 20% (v/v) como aceptores glicosídicos. Las mezclas de reacción se incubaron durante 10 min, 30 min y 1 h a 50 °C y 1.200 rpm, tras lo cual se secaron a vacío. El análisis de la formación de los alquilglicósidos se realizó por CCF (Apartado 3.8.2) y CG/EM (Apartado 3.8.3).

### 3.9.10.2. Síntesis de celooligosacáridos

Las reacciones de transglicosilación para formar celooligosacáridos se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 2 mL. Los sustratos celobiosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa o celohexaosa (Megazyme) se añadieron a una concentración final de 40 mg/mL en tampón citrato sódico 100 mM, pH 5, y se añadieron 0,6 U/mL de las enzimas BGL-1, BGL-2 o BGL-3 de *T. amestolkiae* IJFM A795. Las mezclas de reacción se incubaron a 50 °C durante 1 h, en agitación continua (1.200 rpm), y se pararon las reacciones inactivando las enzimas mediante incubación a 100 °C durante 5 min. Los celooligosacáridos formados se analizaron por CCF (Apartado 3.8.2), y sus valores de masa molecular se determinaron por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Apartado 3.9.2), con algunas variaciones: la adquisición de los espectros se realizó operando en modo reflectrón; la calibración externa se realizó con la mezcla de péptidos Peptide Calibration Standard II (Bruker-Daltonics) y/o con una mezcla de celooligosacáridos (Wako); como matriz se utilizó ácido 2,5-dihidroxibenzoico (Bruker Daltonics), que se preparó disolviendo 10 mg de este compuesto en etanol (Merck): agua (1:2); para la preparación de la muestra se mezclaron 2 µL de la mezcla de celooligosacáridos resultantes de la reacción con 2 µL de disolución matriz.

### 3.9.11. Estudio del secretoma de *T. amestolkiae*

El estudio del secretoma de *T. amestolkiae* se abordó mediante dos técnicas diferentes de proteómica. Como material de partida se utilizó crudo enzimático procedente de cultivos en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Mandels, que contenía Avicel y/o *slurry* ácido de paja de trigo como fuentes de carbono 1% (p/v) (Apartado 3.6). Tras 7 días de incubación se tomaron muestras de 2 mL, se centrifugaron durante 5 min a 14.000 × g y el sobrenadante se secó a vacío.

#### 3.9.11.1. Electroforesis bidimensional

Todos los equipos y productos utilizados en esta técnica son de Bio-Rad, a menos que se indique lo contrario. Se partió de 30 µg de proteína del

cultivo de *T. amestolkiae* en Avicel que se resuspendieron en 140  $\mu$ L de una solución compuesta por urea 7 M, tiourea 2 M, 1-propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio (CHAPS) 4% (p/v), azul de bromofenol 0,0003% (p/v), DTT 18,2 mM y solución de anfolitos 100x Bio-Lyte 3-10 Ampholyte 0,5% (v/v).

En la primera dimensión de la electroforesis, las proteínas se separaron en función de su pI usando un sistema Protean IEF Cell. Para este IEF se utilizaron tiras ReadyStrip IPG de 7 cm con gradientes de pH inmovilizados, de gradiente no lineal 3-10 y 3-6 para ampliar la zona de interés. Cada tira de gel se sometió a una rehidratación activa con la solución de muestra, cubierto todo ello con aceite mineral, durante 12 h a 50 V a 20 °C, tras lo cual se aplicó un programa específico: 250 V durante 1 h, 500 V durante 1 h, 1.000 V durante 1 h, 2.000 V durante 1 h, 8.000 V durante 1 h, 8.000 V hasta alcanzar 3.500 V·h y 200 V hasta superar como mínimo los 12.000 V·h. La temperatura se mantuvo siempre a 20 °C y el límite de intensidad máxima fue de 50  $\mu$ A por cada gel.

Tras el IEF, se equilibraron las tiras incubándolas durante 15 min en 2 mL de tampón Tris-HCl pH 8,8 50 mM, SDS 2% (p/v), urea 6 M y glicerol 30% (v/v), con DTT 52 mM para la reducción de las proteínas. Después se incubaron las tiras, otros 15 min, en el mismo tampón en presencia de iodoacetamida 130 mM, para la alquilación de las proteínas. Finalmente, se lavaron las tiras unos minutos con 2 mL de tampón de carrera de electroforesis (Tabla 3.14). Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente.

En la segunda dimensión las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 12% (p/v). Para ello, se colocaron las tiras procedentes de la IEF directamente sobre los geles preparados el día anterior y conservados a 4 °C. Se usó un sistema refrigerado Mini-Protean 3 Dodeca Cell a 0,5 W por cada gel durante 30 min y luego a 1,5 W/gel hasta que el frente de las muestras alcance el borde inferior. Como marcadores de masa molecular se usaron los marcadores Precision Plus Protein Unstained Standards (10-250 kD).

Los geles se tiñeron con SYPRO Ruby y las bandas de las proteínas a identificar se analizaron por huella peptídica (Apartado 3.9.6). Los puntos isoelectrónicos se calcularon según la distribución del pH en las tiras y los pesos moleculares según los marcadores.

### 3.9.11.2. Análisis masivo de péptidos por nanoLC-MS/MS

Con el fin analizar la producción de celulasas en función de la fuente de celulosa, se utilizaron cultivos de *T. amestolkiae* creciendo con Avicel o *slurry* como fuente de carbono. Se partió de 5 µg de proteína de cada muestra que se resuspendieron en 15 µL de una solución compuesta por Tris-HCl pH 8,8 37,5 mM, SDS 1,5% (p/v), EDTA 1 mM, DTT 1,96 mM, azul de bromofenol 0,005% (p/v) y glicerol 12,5% (v/v), que se desnaturalizaron durante 10 min a 100 °C y se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12% (p/v). Cuando los marcadores de peso molecular preteñidos *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (10-250 kDa) se visualizaron individualmente, aproximadamente después de 10 min a 25 mA en el gel de concentración y 7 min en el gel de separación, se detuvo la electroforesis y se tiñeron las proteínas presentes con Colloidal Blue Staining (Invitrogen). La porción de acrilamida que contenía las proteínas de cada muestra se dividieron en dos fragmentos similares para llevar a cabo réplicas experimentales. Éstos se destiñeron, se redujeron y se alquilaron antes de digerirlas con tripsina, como se describió en el [Apartado anterior](#). Tras esto, analizó la mezcla de péptidos trípticos. Antes de la identificación, las muestras se purificaron con puntas de pipeta ZipTip-C18 (Millipore), eluyendo con ACN 70% (v/v) en bicarbonato amónico 50 mM y se secaron a vacío.

Las mezclas de péptidos trípticos obtenidos se analizaron por nanoLC-MS/MS en un sistema de cromatografía nanoEasy-HPLC (Proxeon) acoplado a una fuente de ionización por electrospray (Proxeon). Los péptidos se disolvieron en 5 µL de tampón A, compuesto por ácido fórmico 0,1% (v/v) y ACN 2% (v/v), y se concentraron en una precolumna de fase reversa EASY-column C18-A1-2cm (Thermo Scientific) usando ácido fórmico 0,1% (v/v) como eluyente. Luego la muestra se fraccionó en una columna capilar Biosphere C18 (75 µm x 200 mm, Nanoseparations) a un flujo de 250 nL/min, aplicando un gradiente lineal del tampón B (ácido fórmico 0,1% (v/v) en ACN): 0-35% en 40 min y 35-45% en 5 min. Para el análisis masivo, los péptidos digeridos con un gradiente de tampón B de 0-35% en 55 min y 35-45% en 16 min. Los péptidos separados se monitorizaron en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) en el modo ión positivo. Los espectros ( $m/z$  300-1.700) se adquirieron a una resolución de 60.000 a una  $m/z$  400 y se seleccionaron los 15 iones más intensos. La identificación de las proteínas se realizó a través del paquete informático Thermo Proteom Discover (v. 1.3.0.339, Thermo Scientific), usando los motores de búsqueda SEQUEST y MASCOT, que evalúan la calidad de la asignación espectro-péptido mediante el parámetro PSM (*Peptide-Spectrum Match*), basado en la

probabilidad de que el péptido esté presente en la muestra. Los parámetros de búsqueda incluyeron dos puntos de corte fallidos, carbamidometilación de las cisteínas (como modificación fija), oxidación de metionina (como modificación variable), tolerancia para péptidos (10 ppm) y tolerancia para fragmentos (0,8 Da). Se estableció un valor de 0,05 como punto de corte del valor de la tasa de falsos positivos (*false discovery rate*, FDR) para las identificaciones. Se aceptaron las identificaciones de proteínas que contenían un único péptido identificado.

Las bases de datos utilizadas para cotejar los datos obtenidos en el análisis masivo fueron NCBIInr (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz>), UniProt ([uniprot.org](http://uniprot.org)) y JGI (*Joint Genome Institute*, [genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf](http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf)). En NCBIInr se utilizaron genomas fúngicos en general, mientras que en UniProt se acotó la búsqueda a hongos del género *Talaromyces*. En el caso de JGI se eligieron los genomas de *T. marneffeii*, *T. stipitatus* y *P. chrysogenum*. Las proteínas identificadas a través de JGI se clasificaron a su vez mediante la base de datos KOG (*euKaryotic Orthologous Groups*), en la que las proteínas identificadas se agrupan según sus características funcionales.

### 3.10. TÉCNICAS MOLECULARES

El agua Milli-Q y el resto de material empleado para las técnicas moleculares descritas a continuación se autoclavó a 120 °C durante 20 min (excepto el procedente de kits comerciales).

#### 3.10.1. Extracción de ADN

A continuación se muestran las diferentes técnicas de aislamiento de ácidos nucleicos teniendo en cuenta el tipo de material de partida y el tipo de ácido nucleico.

Se extrajo ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de los hongos usados en este trabajo, cultivados durante 2 días en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Mandels con glucosa como fuente de carbono. El micelio se separó del líquido de cultivo por filtración aplicando vacío a través de papel de filtro, se lavó varias veces con agua Milli-Q y se conservó a -80 °C. Para la extracción, se homogeneizaron 1,5 g de micelio en un mortero cerámico con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se recogieron 100 mg de este material y se purificó el ADN, siguiendo las instrucciones descritas en el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Para extraer los plásmidos recombinantes de cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se utilizó el kit comercial High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Para la purificación de fragmentos de ADN procedentes de reacciones de amplificación en cadena (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), o de fragmentos de ADN separados en geles de agarosa, se empleó el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante para cada caso.

### 3.10.2. Cuantificación y calidad del ADN

#### 3.10.2.1. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

La concentración de ácidos nucleicos se calculó a partir de la absorbancia a 260 nm de las muestras. Ésta se estimó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific). Para valorar la pureza de las muestras se calculó la relación  $A_{260}/A_{280}$ , siendo el valor de referencia para ADN 1,8.

#### 3.10.2.2. Electroforesis en gel de agarosa

Mediante esta técnica se comprobó la integridad de las muestras de ADN y se confirmó su concentración. También se utilizó para separar los productos de PCR y determinar su masa molecular.

Se prepararon geles de agarosa 0,8% (p/v) en tampón TAE 1x (Tabla 3.17), usado tanto para el gel como para la carrera, y se añadió GelRed (0,5  $\mu$ L/50 mL, Biotium) para facilitar la visualización de las bandas. Las muestras se mezclaron con tampón de carga (Tabla 3.18) y se corrieron en un gel horizontal, en una cubeta con tampón TAE 1x, aplicando un voltaje de entre 50-100 V.

**Tabla 3.17.** Tampón TAE 50x.

Componente	g/L
Tris-base	242,3
	<b>mL/L</b>
Ácido acético	57,2
EDTA 0,5 M pH 8,0	100,0

**Tabla 3.18.** Tampón de carga para electroforesis en gel de agarosa.

Componente	mL/L
Glicerol	590
EDTA 0,5 M pH 8,0	100
	<b>g/L</b>
Azul de bromofenol	1
Xilencianol	2



Tras la electroforesis, las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador UV Gel Doc XR (Bio-Rad). La masa molecular de los fragmentos se estimó por comparación con los marcadores Molecular Weight Marker VI (154-2176 pb) y VII (81-8576 pb) (Roche).

### 3.10.3. Amplificación de ADN

Los fragmentos de ADN se amplificaron por PCR en un termociclador Mastercycler pro S (Eppendorf). La reacción contenía los componentes que se muestran en la [Tabla 3.19](#) y se completó con agua hasta un volumen final de 50  $\mu$ L.

**Tabla 3.19.** Composición de las PCR.

Componente	$\mu$ L
Tampón 10x PCR (Invitrogen)	5
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen)	1,5
dNTP 10 mM (New England Biolabs, NEB)	1,25
Cebador directo	1,25
Cebador inverso	1,25
ADN molde (100 ng/ $\mu$ L)	1
Taq polimerasa 5 U/ $\mu$ L (Invitrogen)	0,5

#### 3.10.3.1. Identificación molecular de *T. amestolkiae*

Para la identificación molecular de *T. amestolkiae* IJFM A795, así como de las cepas CBS 263.93 y 275.95, se secuenciaron las regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) 1 y 2 del ADN ribosómico (ADNr). Además se seleccionaron otros dos marcadores moleculares: los genes de  $\beta$ -tubulina 2 (Bt2) y la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB1), también muy conservados a nivel de especie. Los distintos cebadores empleados se indican en la [Tabla 3.20](#).

Las condiciones empleadas para las PCR fueron un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 50 °C y 90 s a 72 °C y un ciclo final de 5 min a 72 °C.

**Tabla 3.20.** Cebadores utilizados en las PCR para la amplificación de los marcadores genéticos usados en la identificación de las especies fúngicas.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(White <i>et al.</i> , 1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White <i>et al.</i> , 1990)
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTC	(Glass y Donaldson, 1995)
Bt2b	ACCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	(Glass y Donaldson, 1995)
RPB1-F1843	ATTTYGAYGGTGARGARATGAAC	(Houbraken y Samson, 2011)
RPB1-R3096	GRACRGTDCCRTCATAYTTRACC	(Houbraken y Samson, 2011)

Degeneraciones: R=A+G; Y=C+T; M=A+C; K=G+T; S=G+C; W=A+T; H=A+T+C; B=G+T+C; D=G+A+T; V=G+A+C; N=A+C+G+T

### 3.10.3.2. Amplificación de *bgl-1*, *bgl-2* y *bgl-3* de *T. amestolkiae*

Los distintos cebadores usados para amplificar los genes que codifican las BGL de *T. amestolkiae* IJFM A795 (Tabla 3.21) se diseñaron a partir de regiones conservadas de los genes que codifican para las proteínas con mayor homología de las BGL de *T. amestolkiae* IJFM A795 y se adquirieron en Sigma. Los cebadores directos se construyeron lo más cerca posible al extremo 5' del gen, una vez eliminada la secuencia codificante para el péptido señal predicho con el servidor SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011). Los cebadores reversos, por su parte, se construyeron lo más cerca posible al codón de parada en el extremo 3'. En algunos casos se diseñaron cebadores en regiones intermedias para completar la secuenciación. Se utilizó el servidor PCR Primer Stats (Stothard, 2000) y se siguieron las pautas que se indican a continuación: longitud de 18-24 pb, contenido de G+C entre 40-60%, temperatura de fusión de las parejas de cebadores similar (diferencias menores de 5 °C) y ausencia de regiones con potenciales estructuras secundarias internas. En el caso de cebadores degenerados, nunca se superó un grado de degeneración de 512.

Las condiciones empleadas para las PCR fueron un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a la temperatura de anillamiento ( $T_a$ ) específica de cada pareja de cebadores (Tabla 3.22) y 90 s a 72 °C y un ciclo final de 5 min a 72 °C.

**Tabla 3.21.** Cebadores sintéticos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos de PCR.

Nombre	Secuencia 5'→3'
BGL-1Fw5'	CARSAGSTGTAYATCACRACSACTGG
BGL-1Rv3'	YTAATRMCCCAAMCCATTCCTCGC
BGL-1Rv1341	CTTCGGCGGGAACGGAGATGAC
BGL-2Fw190	TAYGCSAACCCMGTYACAGCRT
BGL-2Rv2149	CCAYTTYTGTYTGNRNACRTCCCA
BGL-2Fw795	CTCGATATGACCATGCCAGGC
BGL-2Fw2122	CGAAGAGATTTGAGTTACTG
BGL-2Rv3'	YTRYARGCAYTGRGAGTACCATTG
BGL-2Rv436	TGCCTGGGTACCAGAACT
BGL-2Fw5'	CARKYARYSTCYTGGTC
BGL-3Fw70	GCTGTCGAGTTYGTCTCGCAAT
BGL-3Rv1044	CAATACGCCATTTCGGGAACAGTGCCATTG
BGL-3Fw1044	CAATGGCACTGTTCCCGAATGGCGTATTG
BGL-3Rv2641	CRTARACAGTCTTGGTGTARTTKGTGAC
BGL-3Rv498	CGGGTCCAAGCTGAACATCCAC
BGL-3Fw2147	CGCTGCTTCGCCTTACAAACCA
BGL-3Fw5'	TACTCHCCTCCCGCNTACCCTG
BGL-3Rv3'	CTACTTTCYRATGTYGAGAGCCA



**Tabla 3.22.** Parejas de cebadores usadas para las PCR y sus respectivas  $T_a$ .

Cebador directo	Cebador reverso	$T_a$ (°C)
BGL-1Fw5'	BGL-1 Rv 3'	50
BGL-2Fw190	BGL-2 Rv 2149	52
BGL-2Fw2122	BGL-2 Rv 3'	52
BGL-2Fw5'	BGL-2 Rv 436	50
BGL-3Fw70	BG3 Rv 1044	50
BGL-3Fw1044	BGL-3 Rv 2641	55
BGL-3Fw5'	BGL-3 Rv 498	55
BGL-3Fw2147	BGL-3 Rv 3'	60

#### 3.10.4. Ligación de fragmentos de ADN

Los fragmentos obtenidos por PCR, antes de ser secuenciados, se ligaron al vector pGEM-T Easy (3,0 Kpb) (Promega) utilizando la ligasa del fago T4 (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de ligación se transformaron en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  como se detalla a continuación.

#### 3.10.5. Preparación de células quimiocompetentes y transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$

La preparación de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por [Inoue y cols. \(1990\)](#): se inoculó una colonia aislada de *E. coli* DH5 $\alpha$  en matraz Erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de medio LB y se incubó a 37 °C y 100 rpm durante 14-16 h. De este preinóculo se inocularon 5 mL en matraces de 1L con 200 mL de medio SOB, que se incubaron a 20 °C hasta que la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) alcanzó un valor de 0,55. El cultivo se mantuvo en hielo durante 10 min, se centrifugó ( $2.500 \times g$ , 10 min, 4 °C) y se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en 80 mL de tampón de transformación Inoue ([Tabla 3.23](#)) y se incubó 10 min en hielo para después volver a centrifugar ( $2.500 \times g$ , 10 min, 4 °C) y descartar el sobrenadante. El precipitado se volvió a resuspender en 20 mL de tampón de transformación Inoue al que se añadieron 1,5 mL de DMSO y se incubó en hielo (10 min). Finalmente se repartió en alícuotas que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

**Tabla 3.23.** Tampón de transformación Inoue.

Componente	g/L
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10,88
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,2
KCl	18.65
	<b>mL/L</b>
PIPES 0,5 M pH 6,7	20
Añadir PIPES una vez disueltos los demás componentes y pasar por filtro de 0,22 µm. El tampón debe estar a 4° C a la hora de utilizarlo.	

La transformación de células competentes de *E. coli* DH5α se realizó por choque térmico siguiendo el método de [Sambrook y Russel \(2001\)](#): se descongelaron las células competentes, manteniéndolas en hielo 10 min, se agregó la reacción de ligación (10-15 µL) y la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, las células se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 90 s para favorecer la entrada del plásmido y la mezcla se volvió a incubar en hielo durante 10 min, tras lo cual se añadieron 800 µL de medio LB y las células se incubaron durante 1 h a 37 °C y 180 rpm. La mezcla se repartió, con un asa de vidrio, sobre la superficie de una placa Petri con medio LB-agar-ampicilina-X-gal y se incubó a 37 °C durante 16 h.

### 3.10.6. Secuenciación de ADN

Se llevó a cabo en un secuenciador automático 3730 DNA Analyzer, utilizando el kit comercial BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), en el servicio de secuenciación Secugen S.L.

### 3.10.7. Análisis de secuencias y modelado molecular

El análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se realizó comparándolas con las presentes en la base de datos GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) a través del servidor del NCBI mediante el algoritmo BLAST ([Altschul et al., 1997](#)). Las secuencias se editaron y se ensamblaron con el programa BIOEDIT 7.1.3.0 ([Hall, 1999](#)). De esta forma, a partir de las secuencias obtenidas para BGL-1, BGL-2 y BGL-3 se llevó a cabo una predicción de las regiones codificantes y los dominios funcionales por comparación con las secuencias de los genes de las BGL con los que tienen mayor homología. Mediante la herramienta ProtParam del servidor Expasy ([Gasteiger et al., 2003](#)), se obtuvieron los valores de masa molecular y pI teóricos de las BGL de *T. amestolkiae* IJFM A795, así como la composición de aminoácidos. Los servidores NetNGlyc 1.0 y

NetOGlyc 4.0 (Steentoft *et al.*, 2013) permitieron la predicción de los sitios potenciales de N- y O-glicosilación, respectivamente.

Se generaron modelos tridimensionales por homología utilizando el servidor SWISS-MODEL (Schwede *et al.*, 2003), que elige los moldes automáticamente de entre las estructuras que se encuentran depositadas en la base de datos PDB (*Protein Data Bank*), en base a la similitud de secuencia. Con el índice QMEAN se estima la calidad absoluta del modelo, comparándolo con el original, siendo ideales los valores más próximos a cero. A partir de los modelos generados se predijo la estructura secundaria de las BGL mediante el servidor PDBsum. El programa PyMOL v0.99 (Delano, 2004) sirvió para visualizar y analizar las estructuras.

### 3.10.8. Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos de la cepa de *T. amestolkiae* objeto de estudio, y de las BGL producidas por ella se llevaron a cabo mediante la representación de árboles filogenéticos sin raíz. Éstos se construyeron con MUSCLE, para el alineamiento múltiple de secuencias, y con el método Maximum-Likelihood, para el agrupamiento, ambos implementados en el programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias utilizadas para la construcción de los árboles, incluyendo las obtenidas en este trabajo, están depositadas en GenBank (Tablas 2.24-25).

Con el fin de corroborar la identificación *T. amestolkiae* IJFM A795, se analizaron las secuencias de sus ITS, así como de las diferentes especies de *Talaromyces* relacionadas filogenéticamente (Yilmaz *et al.*, 2012). Las secuencias utilizadas en este análisis se encuentran en la Tabla 3.24.

Se analizaron también las relaciones filogenéticas de las BGL secuenciadas en este trabajo con las de otros hongos similares. Las secuencias aminoacídicas de las BGL empleadas en este análisis se encuentran en la Tabla 3.25.

**Tabla 3.24.** Secuencias nucleotídicas de los marcadores genéticos de las cepas fúngicas usadas para la construcción de los árboles filogenéticos.

Especie	Nº ref. cepa	Nº acceso de las secuencias de nucleótidos		
		ITS	$\beta$ -tubulina	RPB1
<i>T. amestolkiae</i>	IJFM A795	KJ599668	KJ599670	KJ599669
	CBS 274.95	JX965214	JX965321	JX965249
	CBS 884.72	JX315678	JX315622	JX315697
	DTO 179F5	JX315660	JX315623	JX315679
	CBS 263.93	JX315669	JX315625	JX315688
<i>Talaromyces</i> sp.	CBS 169.91	JX315664	JX315634	JX315683
	CBS 265.93	JX315670	JX315635	JX315689
	CBS 624.93	JX315676	JX315636	JX315695
<i>Talaromyces purpurogenus</i>	DTO 189A1	JX315661	JX315638	JX315680
	CBS 286.36	JX315671	JX315639	JX315690
<i>Talaromyces ruber</i>	CBS 370.48	JX315673	JX315630	JX315692
	CBS 196.88	JX315666	JX315627	JX315685
	CBS 868.96	JX315677	JX315631	JX315696
<i>Penicillium crateriforme</i>	CBS 184.27	JX315665	JX315637	JX315684
<i>Talaromyces aculeatus</i>	CBS 28948	JN899378		
	CBS 100105	JN899389		
<i>Talaromyces minioluteus</i>	CBS 64268	JN899346		
<i>Talaromyces verruculosus</i>	CBS 38848	JN899367		
<i>Talaromyces apiculatus</i>	CBS 31259	JN899375		
<i>Talaromyces wortmannii</i>	CBS 39148	JN899352		
<i>Talaromyces subinflatus</i>	CBS 652.95	JN899397		
<i>Talaromyces palmae</i>	CBS 442.88	JN899396		
<i>Penicillium samsonii</i>	CBS 13784	JN899369		
<i>Penicillium coalescens</i>	CBS 10383	JN899366		
<i>Penicillium cecidicola</i>	DAOM 233329	AY787844		
<i>P. purpurogenum</i> var <i>rubrisclerotium</i>	CBS 27035	JN899381		

**Tabla 3.25.** Secuencias aminoacídicas de las BGL usadas para la construcción del árbol filogenético.

Espece	Nº referencia colecciones
<i>T. amestolkiae</i> IJFM A795 (BGL-1)	KM393204
(BGL-2)	KM393203
(BGL-3)	KM393202
<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	XP_002486552
	XP_002485128
	XP_002480480
<i>T. aculeatus</i>	AGA96121
<i>T. purpurogenus</i> KJS506	ACV87737
<i>Talaromyces funiculosus</i> NCL1	AFU91382
<i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224	XP_002152823
	XP_002149046
<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	CAP86346
	CAP94418
	CAP80972
<i>P. decumbens</i> CIC 40361	ADB82653
<i>Penicillium oxalicum</i> GZ-2	AGW24289
<i>Pyrenophora tritici repentis</i> Pt-1C-BFP	XP_001940405
<i>T. reesei</i>	AAA18473
	AAP57758
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	XP_748896
<i>A. niger</i>	AAF74209
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	BAB85988
<i>Ustilago esculenta</i>	BAK61808
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	BAA74958

### 3.11. SACARIFICACIÓN DE *SLURRY* ÁCIDO DE PAJA DE TRIGO CON EL CRUDO ENZIMÁTICO DE *T. amestolkiae*

Con objeto de estudiar la eficacia del crudo enzimático de *T. amestolkiae* IJFM A795 para aumentar el rendimiento de la sacarificación (proceso crucial en la producción de etanol 2G) se ensayó su efecto sobre *slurry* ácido de paja de trigo, proporcionado por Abengoa Bioenergía (Babilafuente, Salamanca) y obtenido mediante *steam explosion* en presencia de ácido sulfúrico diluido. Se utilizó el crudo de *T. amestolkiae* IJFM A795, cultivado en fermentador en medio Mandels con Avicel (Talarozyme) (Apartado 3.6), solo o como suplemento de Celluclast 1.5L y Ultraflo L. Estos dos cócteles comerciales se utilizan como fuente de celulasas pero son deficitarios en BGL. Por esta razón, para tratamientos de biomasa lignocelulósica, suelen suplementarse con NS 50010, que posee niveles altos de esta actividad. Todos los cócteles comerciales fueron proporcionados por Novozymes.

Se realizaron dos tipos de ensayos.

- Se comparó la eficacia de Talarozyme con la de dos crudos comerciales (Cellulast 1,5L y Ultraflo L) para llevar a cabo la sacarificación a partir de *slurry* ácido.
- Se realizaron ensayos de suplementación de los crudos Celluclast 1,5L y Ultraflo L con Talarozyme y NS 50010, ambos ricos en actividad BGL.

En todos los ensayos, se hidrolizaron 300 mg de *slurry* en 1,5 mL de tampón acetato sódico 50 mM, pH 5 y se añadieron 0,5 U/mL de BGL del cóctel correspondiente. Para los ensayos de suplementación, se añadieron otras 0,5 U/mL de BGL de los cócteles elegidos (Talarozyme o NS 50010). Las [Tablas 3.18 y 3.19](#) muestran las mezclas de reacción, que se incubaron a 50 °C y 1.200 rpm. Se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo durante 24 h, se incubaron a 100 °C para inactivar las enzimas y se centrifugaron durante 5 min a  $10.000 \times g$ . La cantidad de glucosa liberada en las reacciones de hidrólisis se midió en el sobrenadante como se explica en el [Apartado 3.5.3](#).



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---





## 4.1.IDENTIFICACIÓN DEL HONGO DE ESTUDIO

El hongo utilizado en este trabajo fue aislado de muestras de cereales cedidas por el grupo de la Dra. Covadonga Vázquez (Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid) y se incluyó en la Colección del Instituto Jaime Ferrán de Microbiología (IJFM) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) con el número de acceso A795. Tras la realización de una búsqueda de especies fúngicas productoras de celulasas, se escogió este hongo por sus altos valores de producción e inicialmente se clasificó como una cepa del género *Penicillium* (Jurado *et al.*, 2007). En este trabajo se ha llevado a cabo su identificación completa teniendo en cuenta sus características moleculares y morfológicas (macro- y microscópicas).

### 4.1.1. Identificación molecular

La identificación molecular de la cepa IJFM A795 se llevó a cabo amplificando y secuenciando la región ITS del ADNr, el marcador genético utilizado con más frecuencia en taxonomía y filogenia de hongos, así como otros genes marcadores, como los que codifican la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (RPB1) y la  $\beta$ -tubulina 2 (Bt2). Las secuencias resultantes presentaron un 100% de homología con las de *P. rubrum* CBS 263.93 y *P. purpurogenum* var. *rubrisclerotium* CBS 274.95 y se incluyeron en GenBank (Figura 4.1A-C).

Con el fin de estudiar en profundidad la relación filogenética entre la cepa IJFM A795 y las especies homólogas, éstas se adquirieron de la colección del CBS y se llevó a cabo un análisis comparativo de sus características morfológicas y de producción de enzimas.

**A) ITS (KJ599668)**

1 CTTCCGTAGG TGAACCTGCG GAAGGATCAT TACCGAGTGC GGGCCCTCGT GGCCCAACCT CCCACCCTTG  
71 TCTCTATACA CCTGTTGCTT TGGCGGGCCC ACCGGGGCCA CCTGGTCGCC GGGGGACATC TGTCCCCGGG  
141 CCCGCGCCCG CCGAAGCGCT CTGTGAACCC TGATGAAGAT GGGCTGTCTG AGTACTATGA AAATTGTCAA  
211 AACTTTCAAC AATGGATCTC TTGGTTCCGG CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA AGTAATGTGA  
281 ATTGCAGAA TCCGTGAATC ATCGAATCTT TGAACGCACA TTGCGCCCCC TGGCATTCCG GGGGGCATGC  
351 CTGTCCGAGC GTCATTCTTG CCCTCAAGCA CGGCTTGTGT GTTGGGTGCG GTCCCCCGG GGACCTGCCC  
421 GAAAGGCAGC GGCGACGTCC GTCTGGTCTT CGAGCGTATG GGGCTTTGTC ACTCGCTCGG GAAGGACTGG  
491 CGGGGGTTGG TCACCACCAA AATTTTACCA CGGTTGACCT CGGATCAGGT AGGAGTTACC CGTGAACTT  
561 AAGCATATCA ATAAG

**B) RPB1 (KJ599669)**

1 ACATTGTCTC GCCACAGCGA AATGGTCCCT TGATGGGTAT CGTGCAGGAC TCTCTGTGTG GTATCTACAA  
71 AATCTGCCGT CGTGACGTTT TCCTTACCAA AGATCAAGTT ATGAACCTCA TGCTTTGGGT TCCCGACTGG  
141 GACGGCTCCA TTCCTCAGCC AGCCATTATC AAACCTAGAC CCCGTGGAC TGGAAGCAG ATCATCAGCA  
211 TGTTTTTACC TTCCGGTCTC AACTTGCTGC GTGTTGATAA AGACAAAGCC CCTCTTTCTG AAAAGTTTTC  
281 GCCATTAGCA GATGGTGGA TACTAGTCCA TGGCGGCCAG TTGATGTACG GCATGTTTTT GAAGAAGACT  
351 GTTGGAGCAT CCGGCGGCGG TGTTGTTTAT ACCATTTTTA ACGAGTACGG TCCTATGGCT GCTGTCTCGT  
421 TTTTCAACGG AGCCCAGCGC GTGGTCAATT ATTGGCTTTT ACACAATGGT TTTTCCATCG GTATTGGTGA  
491 TACAATCCCT GACAAGAAAA CCATTGAACG AATTGAAGGT GCAGTTCGCG CTGGTAAAGC AGAGGTCGAA  
561 GAGATCGTTC AGAGTGCAAC TGAAAATACG TTGGAGGCAT TGCCCGGTAT GAACATTCTG GAGACATTCT  
631 AAAGTAAGGT TTCTCGTGCA TTGAACAATG CTCGTGAGGC TGCTGGGAGT GAGACCGAGA AGAGTTTGAA  
701 GGATCTCAAT AACGCCATTC AAATGGCTAG ATCTGGATCC AAGGGTTCCG CCATTAACAT CTCCAGATG  
771 ACAGCCATCG TTGGACAACA GTCTGTGCGA GGAAAGCGAA TTCCCTTTGG CTTCAAATAC CGCACGCTTC  
841 CTCATTTTAC CAAGGACGAC TATTCTCCGG AGTCGAGAGG ATTTGTTGAG AATCCTACC TTCGTGGTCT  
911 TACACCAACA GAGTTCTTCT TTCACGCTAT GGCTGGTCGT GAAGGTCTTA TTGATACCGC AGTCAAGACT  
981 GCCGAAACGG GTTAT

**C) Bt2 (KJ599670)**

1 CGATGGCTCT GGTGTGTAAG TATTTACAG TTCGAATACA CCTACAGTCC GACAACATCT GATCATCGAC  
71 AGCTACAATG GCTCCTCCGA CCTCCAGTTG GAGCGTATGA ACGTCTACTT CAACGAGGTG CGTTAGAAAAG  
141 TCTCTCGACT CCTATAGAAC AGACACTCAT TCATCTAGGC CTCCGGCAAC AAATACGTCC CCCGTGCCGT  
211 CCTCGTCGAT TTGGAGCCCG GTACCATGGA CGCCGTCCGC GCTGGTCCCT TTGGTCAGCT CTTCCGTCCC  
281 GACAACCTTG TTTTCGGTCA GTCCGGTGCT GGTAACAACT GGGCC

**Figura 4.1.** Secuencias nucleotídicas de los marcadores genéticos utilizados en la identificación de la cepa fúngica IJFM A795.

#### 4.1.2. Identificación morfológica

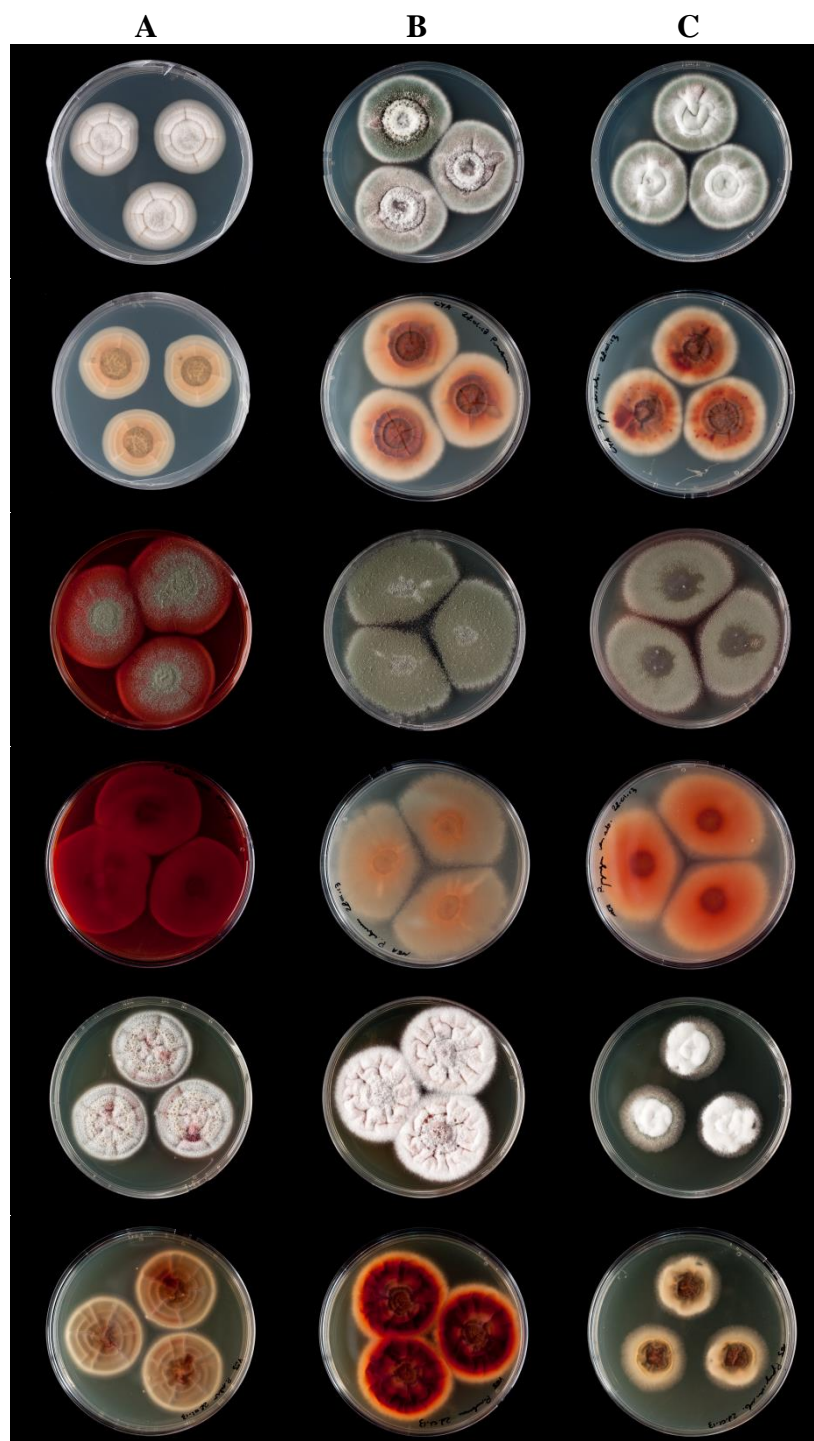
Para analizar las características morfológicas de las colonias de las tres cepas fúngicas, se sembraron en placas de agar con medios CYA, MEA y YES (Figura 4.2). Las principales características, después de 7 días creciendo a 26-28 °C en oscuridad, se describen a continuación.

En el medio agar CYA, los tres hongos produjeron colonias blanquecinas de textura flocosa, sin embargo la cepa IJFM A795 creció algo más despacio, lo que probablemente influyó en la ausencia de esporulación en este medio. En el medio agar MEA, el crecimiento fue mayor en las tres cepas, observándose abundante esporulación y confiriéndoles a las colonias una textura aterciopelada verde-grisácea. El diámetro de las colonias de los tres hongos fue de aproximadamente 3-4 cm, excepto en el caso del hongo *P. purpurogenum* var. *rubrisclerotium* en el medio agar YES, donde creció con mucha dificultad.

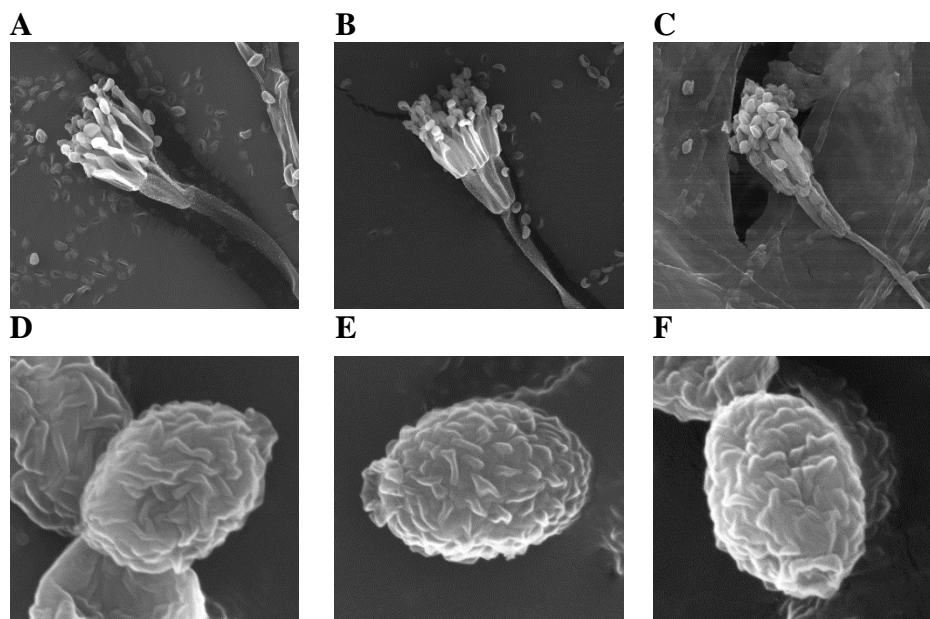
Es interesante destacar la aparición, en la mayoría de los medios, de una coloración rojiza o anaranjada en el micelio, o bien como pigmento difusible, característico de las especies de *Talaromyces* (Frisvad *et al.*, 1990). Las mitorubrininas son los principales metabolitos responsables de la pigmentación en estos hongos (Buchi *et al.*, 1965), observándose diferentes radios de difusión e intensidad entre las diferentes especies (Samson *et al.*, 2011). En el caso de la cepa IJFM A795 en medio agar MEA, la producción de este pigmento fue especialmente intensa, sugiriendo que el hongo objeto de estudio era diferente a las cepas obtenidas del CBS.

Las diferencias morfológicas encontradas en los distintos medios podrían deberse a la adaptación de estos hongos a los diferentes nichos ecológicos de los que fueron aislados: la cepa IJFM A795 procedía de cereales, mientras que la cepa CBS 263.93 se aisló de un lavado broncoalveolar de un paciente con neumonía y la cepa CBS 274.95 procedía de muestras tomadas en una escultura en Praga (Yilmaz *et al.*, 2012).

Las observaciones de las tres cepas al microscopio electrónico de barrido (Figura 4.3), se realizaron inicialmente a partir de muestras de agar de los cultivos. Sin embargo, en esta técnica la deshidratación de las muestras es crucial, y la alta humedad que contienen los medios sólidos con agar provocó el colapso de las hifas. Por esta razón, el estudio se realizó analizando cultivos de los tres hongos crecidos sobre paja de trigo en condiciones de fermentación en estado sólido (Apartado 3.4.2). En las tres cepas se observó una morfología similar, con conidióforos biverticilados simétricos y conidios de aspecto rugoso.



**Figura 4.2.** Colonias en diferentes medios de las cepas IIFM A795 (A), *P. rubrum* CBS 263.93 (B) y *P. purpurogenum* var. *rubrisclerotium* CBS 274.95 (C). De arriba a abajo: anverso y reverso de los medios agar CYA, agar MEA y agar YES.



**Figura 4.3.** Conidióforos y conidios producidos por las cepas IJFM A795 (A y D), *P. rubrum* CBS 263.93 (B y E) y *P. purpurogenum* var. *rubrisclerotium* CBS 274.95 (C y F).

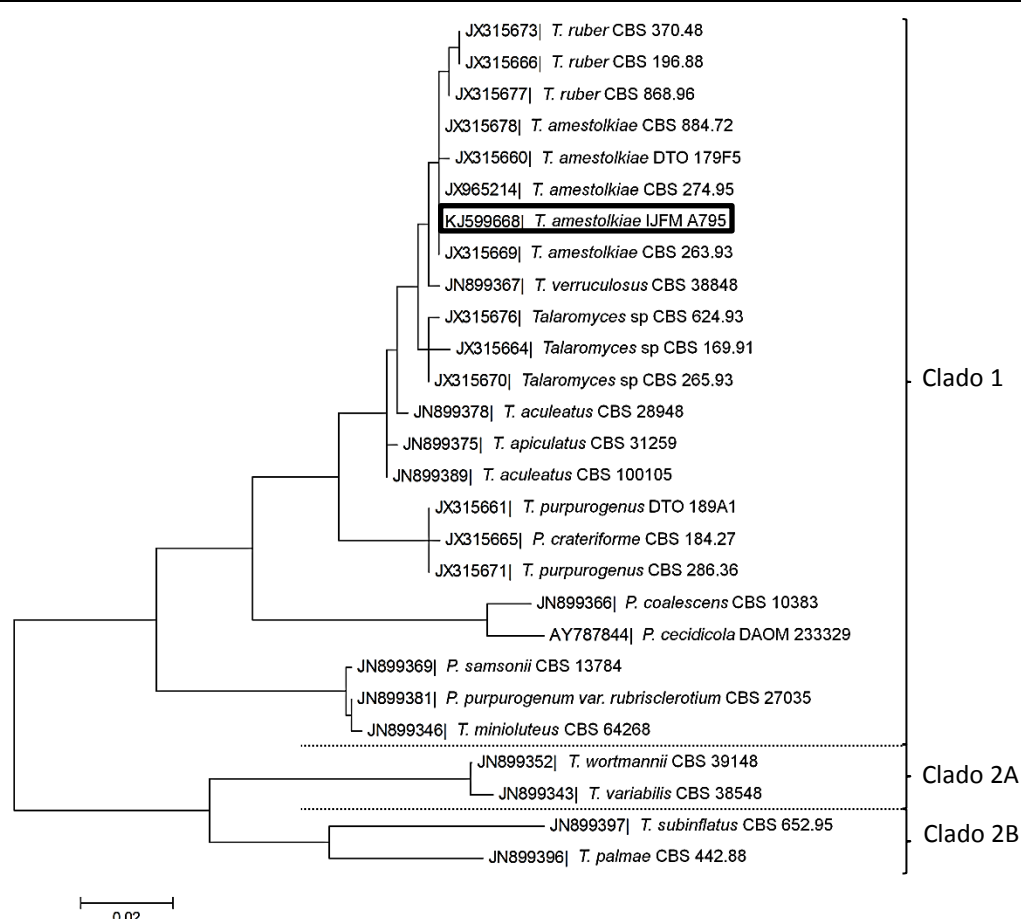
#### 4.1.3. Estudio filogenético de las especies fúngicas estudiadas

Durante la realización de este trabajo, se publicaron dos investigaciones influyentes que condicionaron la identificación de la cepa IJFM A795. [Samson y cols. \(2011\)](#) estudiaron las relaciones taxonómicas entre especies del subgénero *Biverticillium* de *Penicillium* y el estado teleomórfico *Talaromyces* mediante análisis de sus regiones ITS. Según las normas de nomenclatura, se transfirieron todas las especies de *Biverticillium* a *Talaromyces*. Así mismo, [Yilmaz y cols. \(2012\)](#) publicaron un estudio similar, en el que delimitaban la taxonomía de varios hongos del género *Talaromyces* utilizando las secuencias ITS, RPB1 y Bt-2.

Tras la publicación de estos dos artículos, las cepas *P. rubrum* CBS 263.93 y *P. purpurogenum* var. *rubrisclerotium* CBS 274.95 fueron renombradas como *T. amestolkiae* en la colección del CBS. Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados de secuenciación y morfología obtenidos en el presente trabajo, se identificó la cepa IJFM A795 como *Talaromyces amestolkiae*.

A través de alineamientos y análisis cladístico de las secuencias de nucleótidos homólogas de hongos de los géneros *Penicillium* y *Talaromyces*, se dedujo la posición filogenética de *T. amestolkiae* IJFM A795. Según el árbol filogenético basado en las secuencias de las regiones

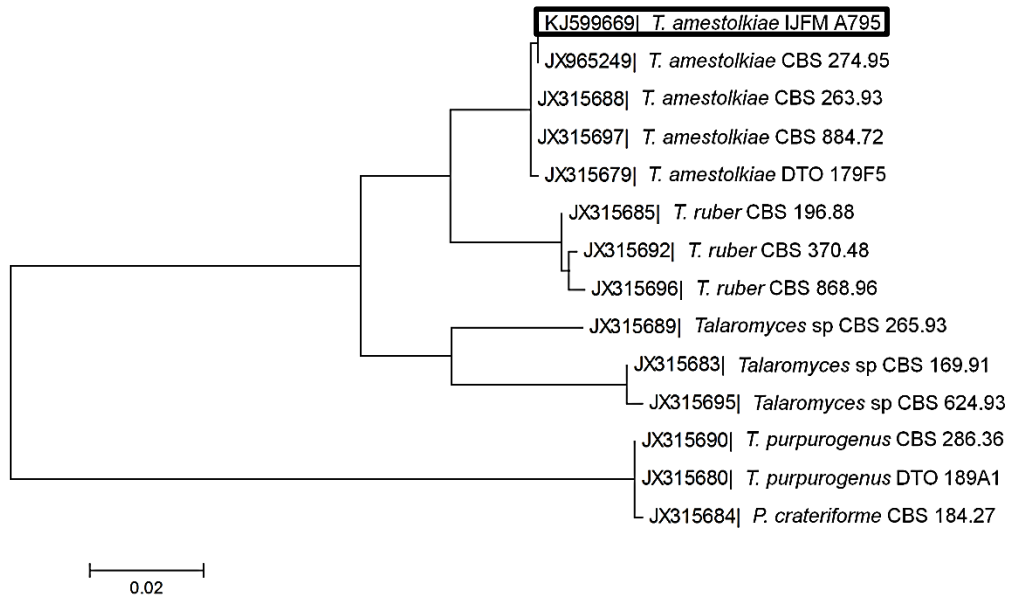
ITS (Figura 4.4), este hongo agrupó en el clado I, en la misma rama que las cepas CBS 263.93 y CBS 274.95. Lo mismo se observó con los árboles filogenéticos basados en las secuencias RPB1 (Figura 4.5A) y Bt2 (Figura 4.5B), confirmando que el hongo de estudio es una cepa de *T. amestolkiae*.



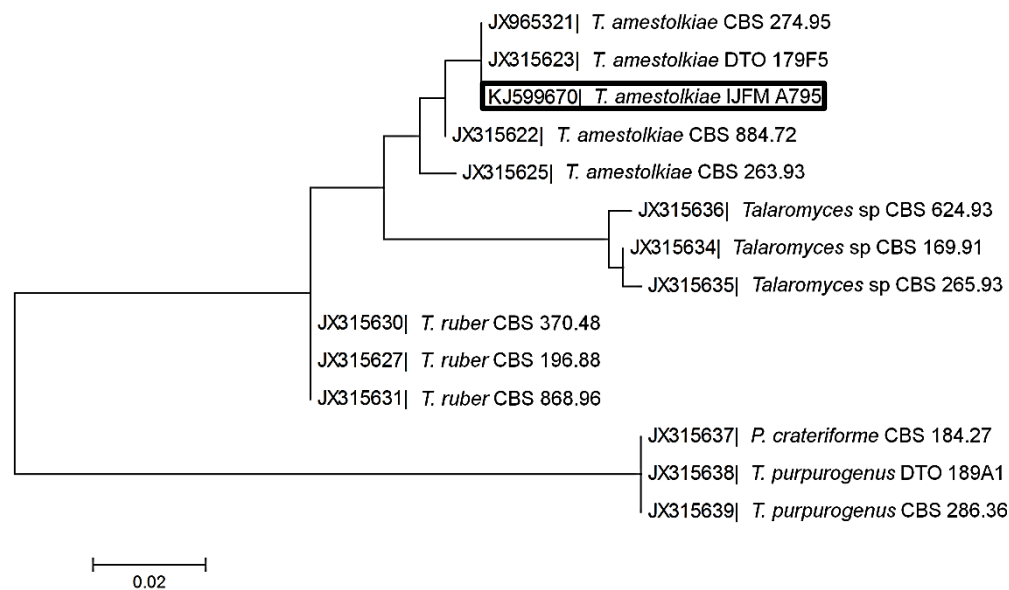
**Figura 4.4.** Árbol filogenético basado en la región ITS de varias cepas de *Penicillium* y *Talaromyces*, resaltando en un recuadro la cepa de estudio. Los números que preceden los nombres de las cepas son los números de acceso de las secuencias publicadas.



A



B



**Figura 4.5.** Árboles filogenéticos basados en los genes *rpb1* (A) y *Bt2* (B) de varias cepas de *Penicillium* y *Talaromyces*, resaltando en un recuadro la cepa de estudio. Los números que preceden los nombres de las cepas son los números de acceso de las secuencias publicadas.



## 4.2.PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE *T. amestolkiae*

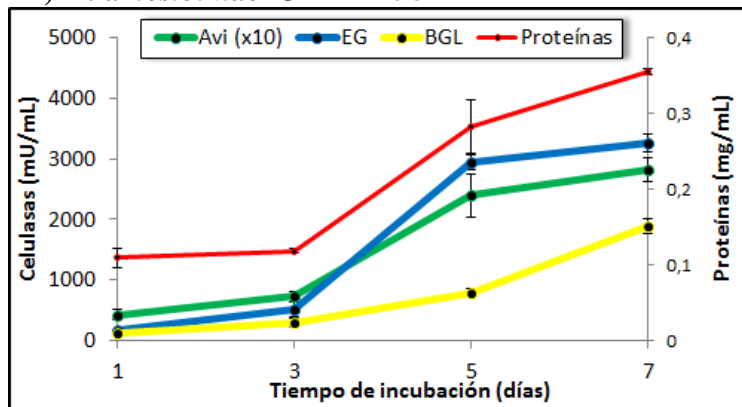
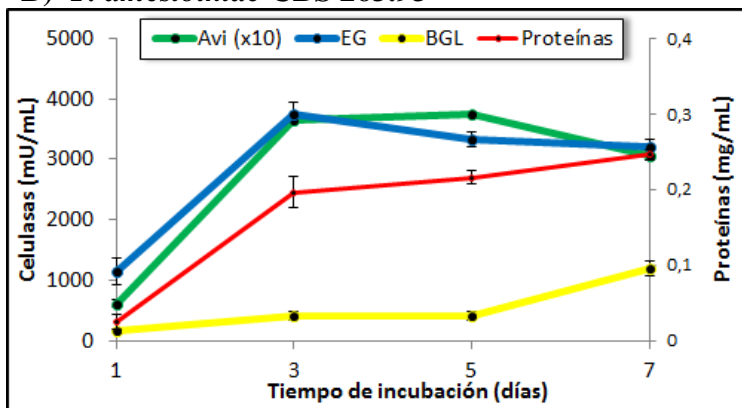
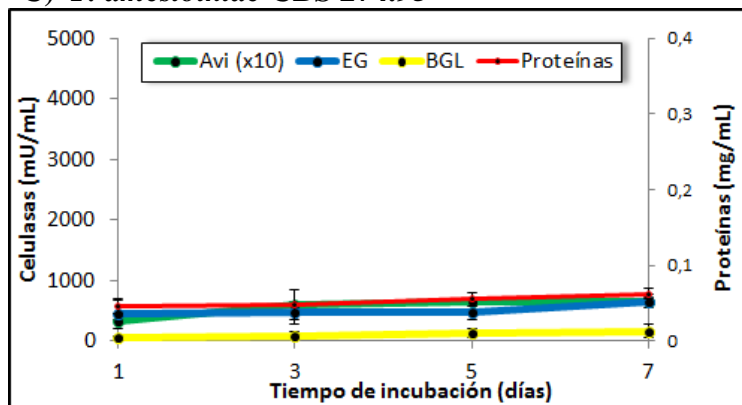
En los últimos años, varias especies del género *Penicillium* y sus formas perfectas (*Talaromyces*) han generado gran interés por su habilidad para producir enzimas implicadas en la degradación de la biomasa vegetal (Gusakov, 2011; Krogh *et al.*, 2004; Marjamaa *et al.*, 2013). Entre los productores de celulasas se encuentran *P. pinophilum* (Jorgensen *et al.*, 2005; Visser *et al.*, 2013), *T. verruculosus* (Skomarovsky *et al.*, 2006) y *T. funiculosus* (Maeda *et al.*, 2013). *Talaromyces cellulolyticus* es uno de los hongos degradadores de celulosa más importantes utilizado en la degradación de biomasa lignocelulósica (Fujii *et al.*, 2014; Houbraken *et al.*, 2014), cuyas celulasas liberan glucosa más eficientemente que las procedentes de *T. reesei* (Fujii *et al.*, 2009). En el presente trabajo se describe por primera vez una cepa de *T. amestolkiae* como productora de enzimas celulolíticas.

### 4.2.1. Optimización de la producción

Con el fin de evaluar la capacidad de producir celulasas de las cepas de *T. amestolkiae* comparadas en el [Apartado 4.1](#), se estudiaron las actividades Avi, EG y BGL que producían al crecer en medio Mandels con Avicel ([Figura 4.6](#)).

La secreción de proteínas puede utilizarse como un marcador del crecimiento fúngico, pues es un factor directamente proporcional a la producción de biomasa. En base a ello, el crecimiento de las cepas IJFM A795 y CBS 263.93 tras 7 días de incubación fue similar. Lo mismo ocurrió con la producción de Avi y EG, alcanzándose niveles semejantes. En el caso de la cepa CBS 274.95, los niveles de las distintas actividades enzimáticas y la concentración de proteínas secretadas al medio fueron muy bajos, lo que podría deberse a su mal crecimiento en las condiciones y medio utilizados.

Es interesante destacar los altos niveles de BGL producidos por la cepa IJFM A795 desde los primeros días de incubación. Generalmente, esta enzima se encuentra en bajas concentraciones en la mayoría de cócteles comerciales y, debido a que es clave en la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol 2G, se seleccionó la cepa IJFM A795 para continuar este trabajo. A partir de ahora nos referiremos a ella únicamente como *T. amestolkiae*.

A) *T. amestolkiae* IJFM A795B) *T. amestolkiae* CBS 263.93C) *T. amestolkiae* CBS 274.95

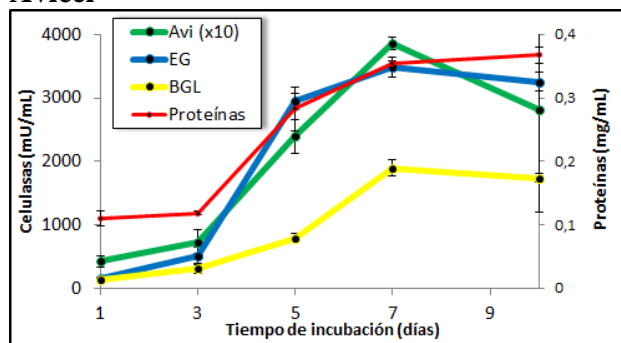
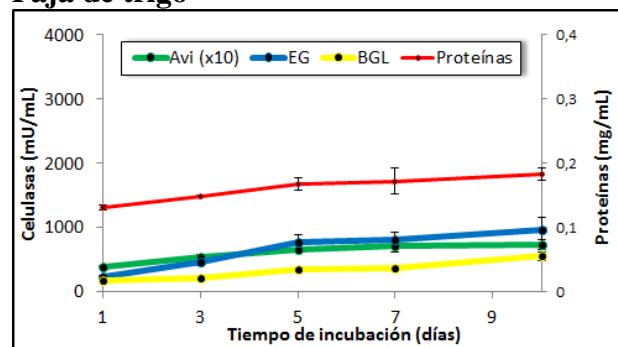
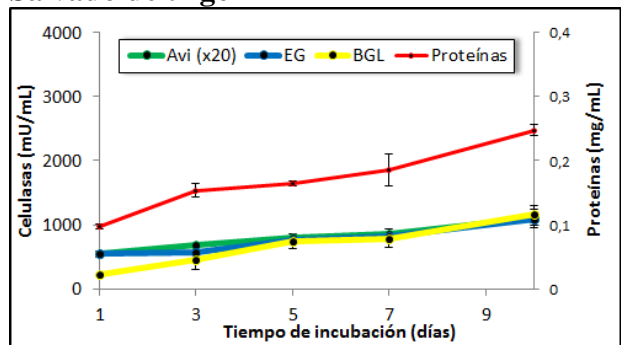
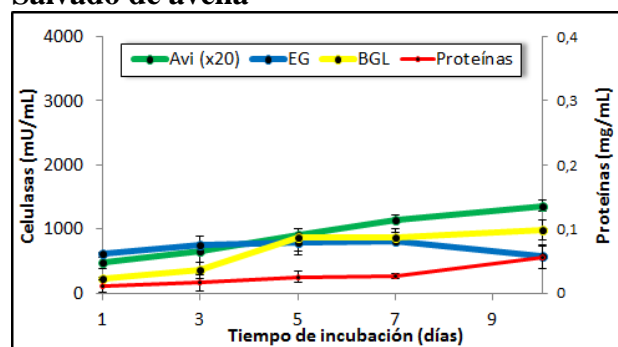
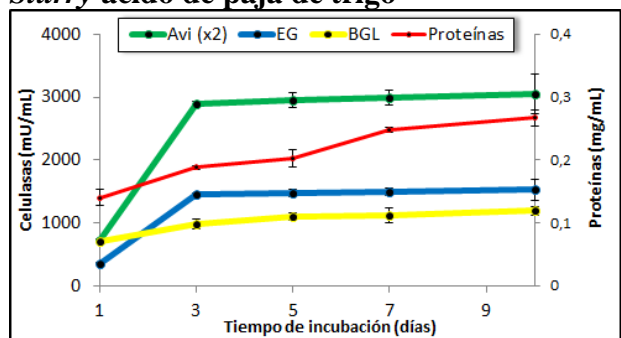
**Figura 4.6.** Evolución de los niveles de Avi, EG, BGL y proteínas en los cultivos de las tres cepas de *T. amestolkiae* comparadas en este trabajo, creciendo en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Mandels con Avicel.

Con objeto de seleccionar una fuente de carbono adecuada para la producción de celulasas de *T. amestolkiae*, se estudiaron las actividades Avi, EG y BGL en medio Mandels con diferentes fuentes de carbono: Avicel, paja de trigo, salvado de trigo, salvado de avena y *slurry* ácido de paja de trigo (Figura 4.7).

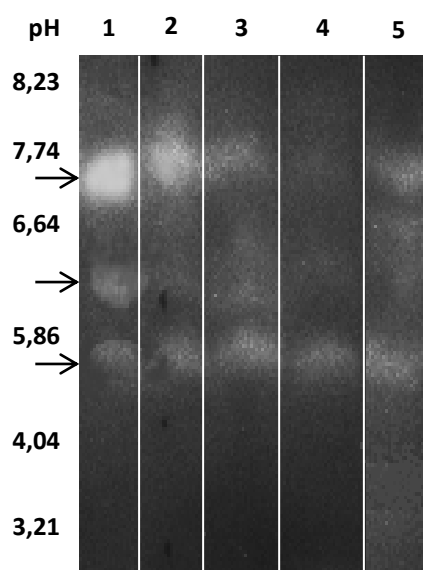
En presencia de Avicel, *T. amestolkiae* alcanzó el máximo de producción de celulasas el día 7 de cultivo, con unos valores de 0,4 U/mL, 3,5 U/mL y 1,9 U/mL para Avi, EG y BGL, respectivamente. En presencia de los sustratos lignocelulósicos, los niveles de estas tres actividades fueron mucho menores.

Aunque en todos los casos se partió de la misma concentración inicial de sustrato, el contenido en celulosa varía en función de la fuente lignocelulósica escogida. Esto influye en la secreción de celulasas, siendo menor en presencia de sustratos lignocelulósicos. El Avicel (celulosa microcristalina) es totalmente metabolizable por el hongo, y puede aprovecharse completamente como fuente de carbono. En el resto de sustratos, la celulosa no se encuentra tan accesible, pues antes debe ser separada de hemicelulosa y lignina (Perez *et al.*, 2002). En este sentido, es probable que alargando los tiempos de cultivo podrían obtenerse niveles similares de celulasas en los sustratos menos favorables, como puede intuirse en el caso de la paja y el salvado de trigo (Figura 4.7), pues tras 10 días de cultivo continúa aumentando el nivel de enzimas celulolíticas.

El patrón de producción de BGL en las distintas condiciones de cultivo se estudió mediante zimogramas de las proteínas presentes en el crudo tras ser separadas en función de su pI. Para ello, se cargaron en un gel de IEF cantidades equivalentes de proteínas procedentes de muestras tomadas tras 7 días de cultivo (Figura 4.8). En todos los casos se observaron tres bandas con actividad BGL, con unos valores aproximados de pI de 5,7, 6,2 y 7,4, indicando que se expresaron tres BGL diferentes, o distintas isoformas de la misma enzima, tanto en presencia de Avicel como de los sustratos lignocelulósicos. Sin embargo, la intensidad de las bandas fue mayor en el medio con Avicel, donde se produjeron los mayores niveles de actividad BGL, por lo que se escogió éste como fuente de carbono para la producción de estas enzimas.

**Avicel****Paja de trigo****Salvado de trigo****Salvado de avena****Slurry ácido de paja de trigo**

**Figura 4.7.** Evolución de los niveles de Avi, EG, BGL y proteínas en los cultivos de *T. amestolkiae*, creciendo en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Mandels con diferentes fuentes de carbono.



**Figura 4.8.** Análisis de la actividad BGL por zimograma tras el IEF del crudo enzimático de *T. amestolkiae*, creciendo en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Mandels con Avicel (1), paja de trigo (2), salvado de trigo (3), salvado de avena (4) y *slurry* ácido de paja de trigo (5). Se señalan con flechas las bandas de actividad BGL.

Las pruebas iniciales de producción de celulasas se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo. Con objeto de escalar la producción, se realizaron cultivos en matraces Erlenmeyer de 1 L con 100 mL de medio y en un fermentador de 1,5 L con 1,3 L de medio (Apartado 3.6). En la Tabla 4.1 se comparan los valores máximos obtenidos en los diferentes experimentos.

En los experimentos en matraces (Figuras 3.9A y 3.9B), los valores máximos de las actividades Avi, EG y BGL fueron similares en las dos condiciones, alrededor de 0,5, 3,5 y 2,0 U/mL, respectivamente. Sin embargo, cabe destacar que los valores máximos se consiguieron dos días antes en matraces Erlenmeyer de 1 L (Tabla 4.1). Estos resultados sugieren que la relación superficie/volumen es muy importante para favorecer la producción enzimática, lo que queda confirmado por el aumento en la secreción de proteínas y, por tanto, de biomasa fúngica.

En el caso del experimento en fermentador (Figura 4.9C), los valores máximos de actividad se obtuvieron a los 4 días de cultivo, un día antes respecto a la producción en matraces Erlenmeyer de 1 L con 100 mL de medio (Tabla 4.1). En este caso, casi se duplicó la secreción de todas las

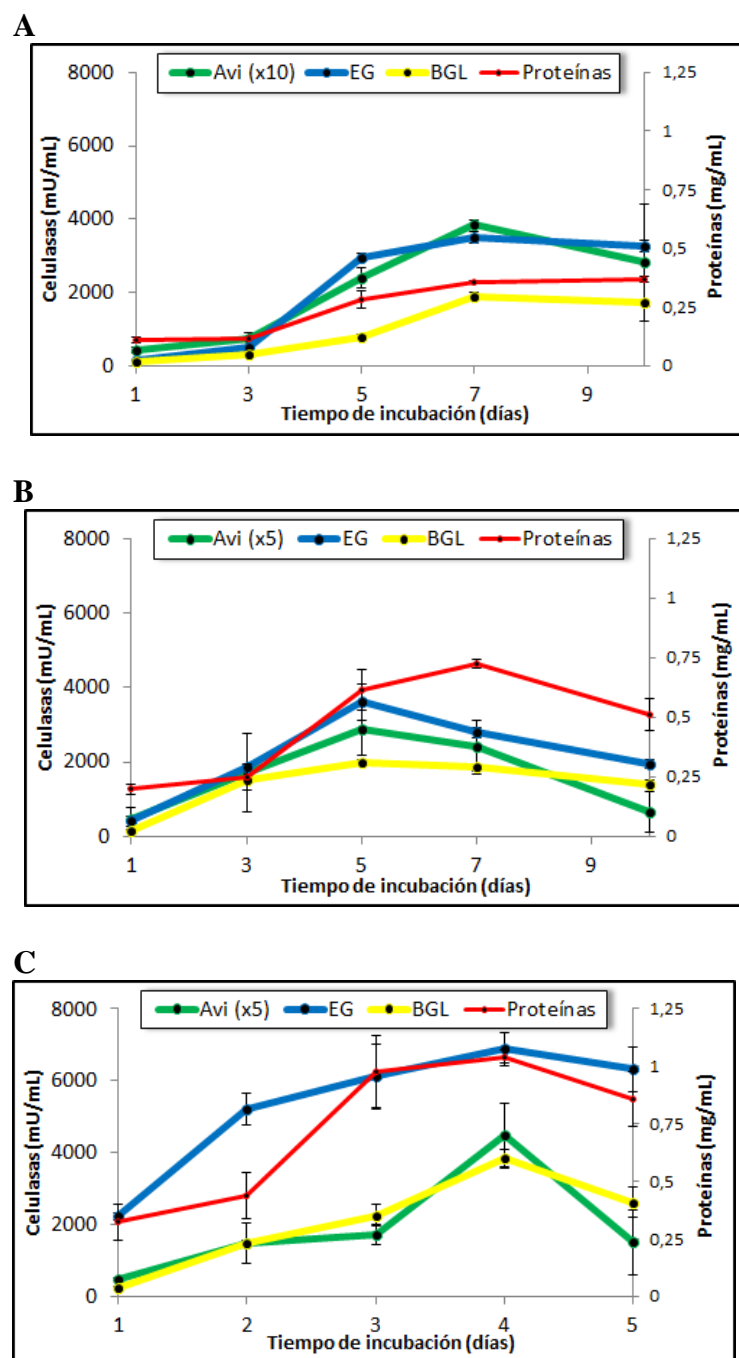
actividades celulolíticas, llegando a alcanzar alrededor de 1,0 U/mL de Avi, 7,0 U/mL de EG y 4,0 U/mL de BGL. En todos los casos la temperatura de incubación fue la misma, por lo que los resultados sugieren que los niveles de aireación y agitación del fermentador fueron determinantes para aumentar el rendimiento en la secreción de las enzimas.

**Tabla 4.1.** Niveles máximos de Avi, EG y BGL en los diferentes cultivos de *T. amestolkiae* creciendo en medio Mandels con Avicel.

	Matraces de 250 mL con 50 mL de medio		Matraces de 1 L con 100 mL de medio		Fermentador	
	U/mL	Día	U/mL	Día	U/mL	Día
<b>Avi</b>	0,39	7	0,61	5	0,89	4
<b>EG</b>	3,49	7	3,62	5	6,90	4
<b>BGL</b>	1,90	7	2,09	5	3,83	4

Como se ha comentado, una de las principales ventajas del uso de cepas de *Penicillium* o *Talaromyces* para producir celulasas consiste en la secreción de mayores niveles de actividad BGL respecto a los alcanzados con cepas de *Trichoderma* (Berlin *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2009). Krogh y cols. (2004) analizaron la producción de celulasas en matraces, a partir de cultivos procedentes de doce hongos filamentosos del género *Penicillium* y compararon las actividades con las de *T. reesei* RUT-C30. Cuatro especies mostraron una mayor producción de celulasas, obteniéndose un rango de 0,97-2,45 U/mL de BGL (Tabla 4.2), utilizando celulosa 2% (p/v) como inductor de estas enzimas. Bajo las mismas condiciones, *T. reesei* RUT-C30 produjo 0,03 U/mL de BGL.

La gran variedad de métodos estandarizados para determinar la actividad de estas enzimas y las diferentes condiciones experimentales empleadas dificultan la comparación de la producción de celulasas con los datos publicados en la bibliografía. Sin embargo, en el presente trabajo, *T. amestolkiae* produjo 2,09 U/mL de BGL en matraces de 1 L, valores similares a los datos reportados por Krogh y cols. (2004) pero utilizando una concentración menor de Avicel (1%, p/v). En la Tabla 4.2 se muestra un resumen de la producción de celulasas por varias especies de *Penicillium*, forma imperfecta de *Talaromyces*, en medio líquido en matraces y fermentador.



**Figura 4.9.** Evolución de los niveles de Avi, EG, BGL y proteínas en los cultivos de *T. amestolkiae*, creciendo en medio Mandels con Avicel en matraces de 250 mL con 50 mL de medio (A), matraces de 1 L con 100 mL de medio (B) y fermentador (C).

**Tabla 4.2.** Producción de celulasas por varias especies del género *Penicillium*.

Microorganismo	Sustrato	EG (U/mL)	FPU <sup>1</sup> (U/mL)	BGL (U/mL)	Referencia
<i>Penicillium minioluteum</i> IBT 21486	Solka-Floc <sup>2</sup>	9,0	0,29	1,70	(Krogh <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. pinophilum</i> IBT 10872		6,0	0,32	2,45	
<i>Penicillium verruculosum</i> IBT 18366		12,0	0,37	0,97	
<i>P. brasilianum</i> IBT 20888		98,0	0,68	1,09	
<i>P. funiculosum</i> ATCC 11797	CMC, Avicel, bagazo de caña de azúcar	3,59	0,35	1,84	(de Castro y Pereira, Jr., 2010)
<i>P. brasilianum</i> IBT 20888	Sigmacell <sup>2</sup> , abeto pretratado	19	0,59	3,5	(Jorgensen y Olsson, 2006)
<i>P. brasilianum</i> IBT 20888	Solka-Floc, xilano de abedul, xilano de avena	ND <sup>3</sup>	0,75	ND	(Jorgensen <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. pinophilum</i> IBT 4186		ND	0,81	ND	
<i>Penicillium persicinum</i> IBT 13226		ND	1,7	ND	
<i>P. decumbens</i> 114-2	Salvado de trigo	5,4	0,83	2,39	(Sun <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. decumbens</i> JU-A10		10,6	1,96	1,02	
<i>P. echinulatum</i> 9A02S1	Celulosa más lactosa	ND	1,6	0,5	(Sehnem <i>et al.</i> , 2006)
<i>Penicillium citrinum</i> MTCC 6489	Salvado de trigo	1,89	1,72		(Dutta <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. echinulatum</i> S1M29	Celulosa microcristalina más salvado de soja más glucosa o sacarosa	17	2,0	1,5	(Dillon <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. echinulatum</i> 9A02S1	Celulosa más glucosa más metilxantinas		3,1	2,9	(Camassola y Dillon, 2007)
<i>P. janthinellum</i> EU2D-21	Avicel, Solka-Floc, celulosa o papel de seda más salvado de trigo	94,4	3,49	3,2	(Singhvi <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. pinophilum</i> NTG III/6 <sup>4</sup>	Solka-Floc, paja de cebada, salvado de trigo, Avicel	175	9,8	38	(Brown <i>et al.</i> , 1987)
<i>P. occitanis</i> Pol6 <sup>4</sup>	Avicel	12	12,6	17,5	(Chaabouni <i>et al.</i> , 1994)
<i>P. verruculosum</i> (varias cepas) <sup>4</sup>	Celulosa microcristalina, modo lote alimentado con glucosa	496	ND	61	(Solov'eva <i>et al.</i> , 2005)

<sup>1</sup> Unidad de papel de filtro.<sup>2</sup> Marcas comerciales de celulosa microcristalina, similares al Avicel.<sup>3</sup> Actividad no determinada.<sup>4</sup> Actividades obtenidas en fermentador.



La elección del sustrato adecuado y el escalado del proceso son factores cruciales para la producción de enzimas. Cuando *T. amestolkiae* se cultivó en fermentador, los niveles de producción de celulasas aumentaron notablemente, disminuyendo el tiempo necesario para obtenerlos (Tabla 4.1). Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios con varios mutantes de *T. reesei* (Esterbauer *et al.*, 1991). Es preciso destacar que la actividad BGL obtenida en fermentador fue casi el doble a la obtenida en matraces, un efecto descrito anteriormente en *P. pinophilum*, *P. occitanis* y *P. verruculosum* (Brown *et al.*, 1987; Chaabouni *et al.*, 1994; Solov'eva *et al.*, 2005) (Tabla 4.2).

#### 4.2.2. Purificación de las BGL

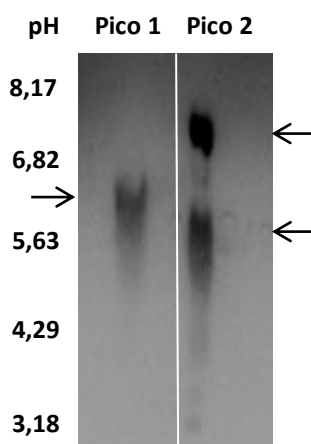
El hecho de que las celulasas fúngicas sean secretadas al medio facilita su obtención y posterior purificación. Las estrategias para conseguirlo están en continuo desarrollo y, en general, se necesitan varios pasos cromatográficos. Aunque se ha reportado el proceso de purificación de BGL de varias cepas fúngicas (Chandra *et al.*, 2013; Jagtap *et al.*, 2013; Krogh *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012), es la primera vez que se estudian las de una cepa de *T. amestolkiae*.

Para llevar a cabo la purificación de las BGL secretadas por *T. amestolkiae* se partió del crudo obtenido en fermentador, en las condiciones mencionadas anteriormente. Tras 4 días de cultivo (cuando se obtuvieron los niveles máximos de actividad BGL) el líquido de cultivo se concentró (75 veces) y se dializó por ultrafiltración, tras lo cual se procesó en diferentes pasos cromatográficos. En la Tabla 4.3 se muestra el rendimiento del proceso de purificación llevado a cabo en este trabajo. Tras la ultrafiltración se mantuvieron los niveles de actividad BGL pero disminuyó la concentración total de proteínas aproximadamente 3 veces. Esto puede deberse al uso de membranas de ultrafiltración de 10 kDa, que facilitan la eliminación de las proteínas y péptidos menores de este tamaño, enriqueciéndose el crudo con las enzimas de interés.

Inicialmente se utilizaron cartuchos estándar de intercambio aniónico (HiTrap QFF, GE Healthcare), pero no se lograron separar picos definidos con actividad BGL (datos no mostrados). Por ello, se utilizó el cartucho HiTrap Capto Adhere con el que se separaron dos picos con actividad BGL (Figura 4.11A). El pico 1 apareció durante la aplicación del gradiente salino. Cuando éste terminó y el cartucho comenzó a reequilibrarse, eluyó el pico 2.

Mediante zimogramas tras IEF (Apartado 3.9.5), se observó que el pico 1 tenía una sola proteína con actividad BGL (pI ~ 6), mientras que el pico 2

tenía dos proteínas con esta actividad (pI ~ 5,8 y 7) (Figura 4.8), similares a las encontradas previamente en el crudo enzimático (Figura 4.10).



**Figura 4.10.** Análisis de la actividad BGL por zimograma tras IEF de los picos 1 y 2, obtenidos tras pasar el crudo enzimático de *T. amestolkiae* por el cartucho HiTrap CaptoAdhere.

La proteína con menor pI no eluyó durante el gradiente, como ocurrió con la que aparece en el pico 1, lo que puede explicarse por la naturaleza heterogénea del lecho de separación, que consta de un ligando multimodal diseñado para la purificación de anticuerpos monoclonales cuya selectividad es diferente a la de los intercambiadores iónicos tradicionales. Así, además de interacciones iónicas, se producen otros tipos de contactos intermoleculares como puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas, que pueden ser muy fuertes con las BGL del pico 2, haciendo que queden retenidas hasta el final de este paso de purificación.

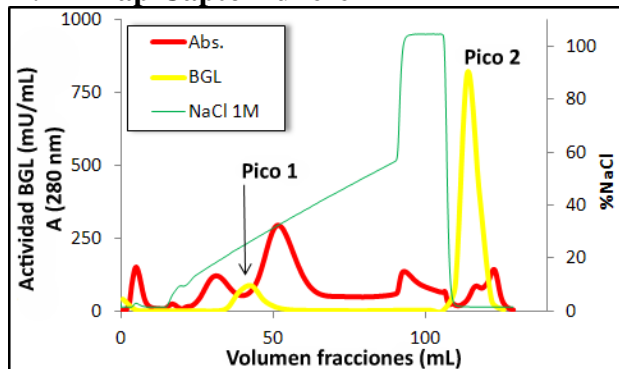
Tras la etapa inicial, cada pico se procesó de diferente forma con objeto de purificar cada una de las isoformas que contenían. Los picos 1 y 2 se aplicaron a las columnas de intercambio aniónico Resource Q y Mono Q, respectivamente. En ambas columnas se separan con alta resolución proteínas cargadas negativamente, aunque en el caso de la Mono Q la separación es más eficaz, pudiendo purificarse de forma más eficiente proteínas en base a pequeñas diferencias de pI.

Cuando se aplicó el pico 1 a la columna Resource Q, eluyó un pico con actividad BGL (pico 1.1) (Figura 4.11B), cuya homogeneidad se confirmó por SDS-PAGE (Figura 4.12A, carril 1). De esta forma se purificó una proteína, a la que se llamó BGL-1, con una masa molecular aproximada de 70 kDa.

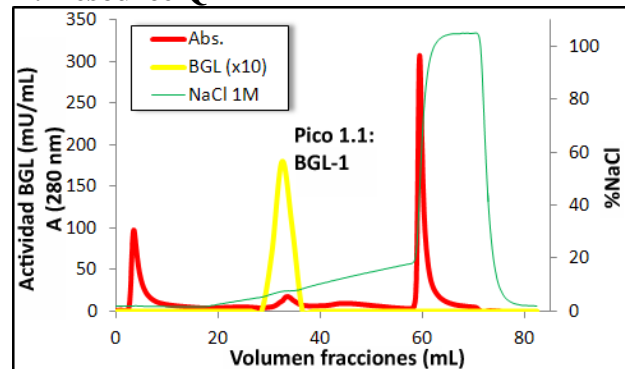
Cuando se aplicó el pico 2 a la columna Mono Q, eluyeron dos picos con actividad BGL (Figura 4.11C). El pico 2.1 contenía una segunda BGL (BGL-2) además de otras proteínas, por lo que para completar su purificación fue necesaria una etapa cromatográfica adicional de exclusión molecular. Tras SDS-PAGE se observó que el pico 2.2 contenía únicamente una proteína con actividad BGL (BGL-3), con una masa molecular aproximada de 100 kDa (Figura 4.12A, carril 3).

El pico 2.1, procedente de la etapa anterior, se aplicó a la columna de exclusión molecular Superdex 75 HR 10/30, eluyendo el pico 2.1.1 (Figura 4.11D). Tras SDS-PAGE se observó que este pico contenía únicamente una proteína con actividad BGL (BGL-2), con una masa molecular aproximada de 100 kDa (Figura 4.12A, carril 2), similar a la obtenida para BGL-3.

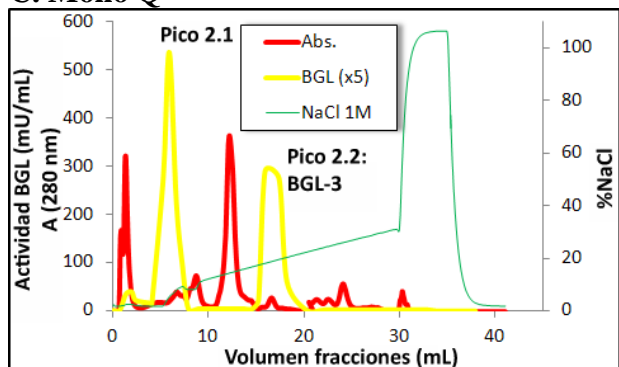
#### A. HiTrap Capto Adhere



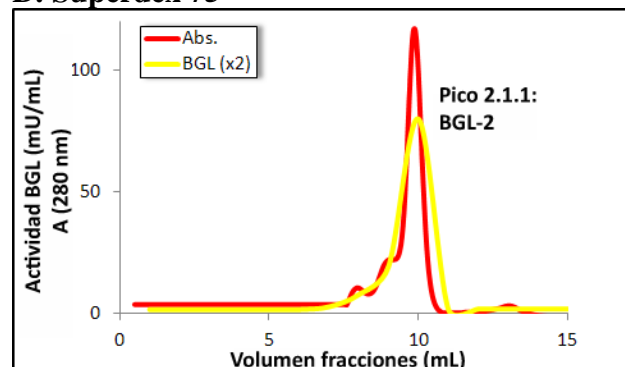
#### B. Resource Q



#### C. Mono Q



#### D. Superdex 75



**Figura 4.11.** Perfiles cromatográficos de la purificación de las BGL de *T. amestolkiae*.

**Tabla 4.3.** Rendimiento de la purificación de las enzimas BGL-1, BGL-2 Y BGL-3 de *T. amestolkiae* en medio Mandels con Avicel.

**BGL-1**

<b>Etapas</b>	<b>Proteínas totales (mg)</b>	<b>Actividad total (U)</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Grado de purificación</b>
Líquido de cultivo	152,1	1080,0	7,1	100,0	1,0
Ultrafiltración	53,4	1039,7	19,5	96,3	2,7
HiTrap Capto Adhere	9,0	209,2	23,4	19,4	3,3
Resource Q	1,9	136,3	71,0	12,6	10,0

**BGL-2**

<b>Etapas</b>	<b>Proteínas totales (mg)</b>	<b>Actividad total (U)</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Grado de purificación</b>
Líquido de cultivo	152,1	1080,0	7,1	100,0	1,0
Ultrafiltración	53,4	1039,7	19,5	96,3	2,7
HiTrap Capto Adhere	15,8	795,6	50,4	73,7	7,1
Mono Q 5/50	7,6	596,4	78,5	55,2	11,1
Superdex 75 HR 10/30	0,8	66,1	82,6	6,1	11,6

**BGL-3**

<b>Etapas</b>	<b>Proteínas totales (mg)</b>	<b>Actividad total (U)</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Grado de purificación</b>
Líquido de cultivo	152,1	1080,0	7,1	100,0	1,0
Ultrafiltración	53,4	1039,7	19,5	96,3	2,7
HiTrap Capto Adhere	15,8	795,6	50,4	73,7	7,1
Mono Q 5/50	2,8	195,2	69,7	18,1	9,8

### 4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS BGL DE *T. amestolkiae*

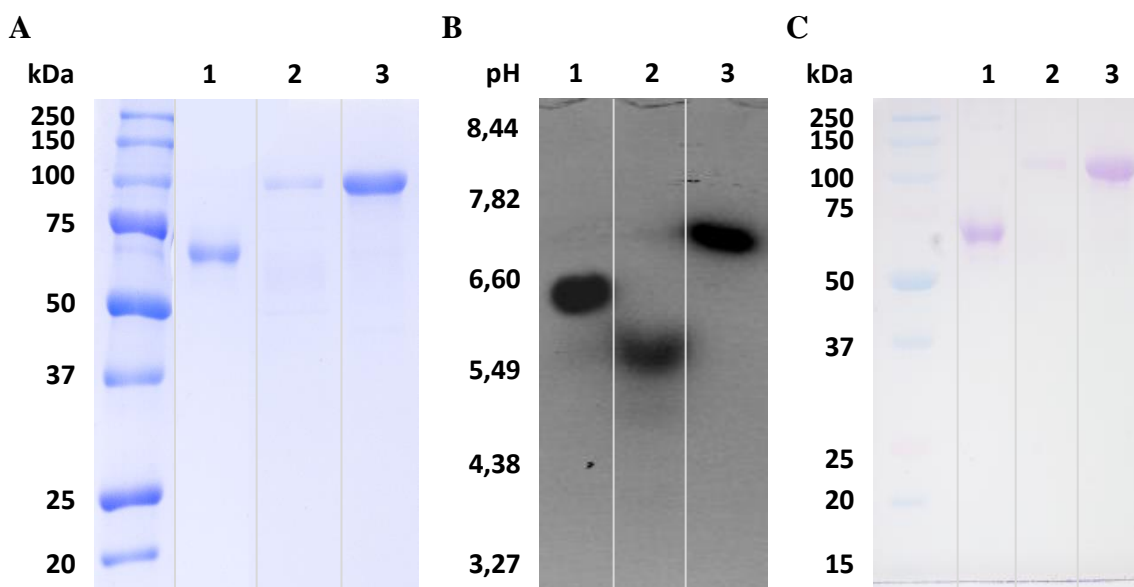
La [Tabla 4.4](#) incluye las principales propiedades fisicoquímicas de las tres BGL de *T. amestolkiae* purificadas, detalladas a continuación.

**Tabla 4.4.** Principales propiedades fisicoquímicas de las enzimas BGL-1, BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae*.

Enzima	$M_w$ (kDa) SDS-PAGE	$M_w$ (kDa) MALDI-TOF	$M_w$ (kDa) Superose 12	pI	pH ópt.	Temperatura ópt. (°C)
BGL-1	70	62,6	66,9	6,5	4,0	50
BGL-2	100	97,2	83,0	5,6	4,0	60
BGL-3	100	107,0	221,8	7,2	4,0	60

#### 4.3.1. Masa molecular y punto isoeléctrico

Los valores aproximados de masa molecular de las BGL purificadas, determinados mediante SDS-PAGE ([Figura 4.12A](#)), fueron 70 kDa para BGL-1 y 100 kDa para BGL-2 y BGL-3.



**Figura 4.12.** Análisis por SDS-PAGE (A), zimograma de la actividad BGL tras IEF (B) y tinción de PAS en SDS-PAGE (C) de las enzimas BGL-1 (1), BGL-2 (2) y BGL-3 (3) de *T. amestolkiae*.

La masa molecular exacta de estas proteínas se calculó por espectrometría de masas MALDI-TOF, siendo 62,6, 97,2 y 107,0 para BGL-1, BGL-2 y BGL-3, respectivamente. Los elevados valores de masa molecular de BGL-2 y BGL-3 son similares a los encontrados en varias BGL de otras especies de *Penicillium* o *Talaromyces* ([Eyzaguirre et al., 2005](#); [Jeya et al., 2010](#); [Lee et al., 2013](#)). Aunque la técnica de MALDI-TOF es muy fiable, pues

no implica la ruptura de los puentes disulfuro entre monómeros, durante la preparación de la muestra o durante la ionización, los agregados no covalentes se disocian. Por ello, es imposible determinar, en soluciones acuosas, el grado de oligomerización que predomina en las BGL mediante esta técnica. Así, para analizar la estructura cuaternaria de las BGL se utilizó cromatografía de exclusión molecular. Los datos obtenidos con esta técnica, sugirieron que BGL-1 y BGL-2 son monómeros, mientras que BGL-3 es un dímero funcional no covalente (Tabla 4.4).

Mediante IEF de las BGL purificadas se analizaron los valores de sus pI, siendo 6,5, 5,6 y 7,2 para BGL-1, BGL-2 y BGL-3, respectivamente (Figura 4.12B). Estos valores fueron similares a los obtenidos previamente con el crudo enzimático (Figura 4.8) y en el primer paso de purificación de las mismas (Figura 4.10). La mayoría de BGL muestran valores de pI entre 4-6 (Eyzaguirre *et al.*, 2005), aunque en el caso de *T. amestolkiae* se producen BGL más básicas, lo que sugiere diferencias significativas en su composición de aminoácidos y/o azúcares, en el caso de tratarse de glicoproteínas. El pI de BGL-3 resultó ser más alto de lo esperado dado su comportamiento cromatográfico, pues se retuvo en el lecho de intercambio aniónico al ser aplicada a pH 6, un punto por debajo de su pI. A este pH no debería estar cargada negativa sino positivamente, y por lo tanto ser eluída en el volumen de exclusión. Sin embargo, la enzima se retuvo y eluyó como si tuviera menor pI. Esto puede deberse a su gran tamaño y a su carácter dimérico, ya que se ha visto que el comportamiento de proteínas grandes y agregadas en cromatografía de intercambio iónico presenta anomalías debido a impedimentos estéricos (Rao, 2001; Yang *et al.*, 2002).

#### 4.3.2. Glicosilación

La glicosilación de proteínas es una de las principales modificaciones postraduccionales de las mismas. Se trata de la unión covalente de carbohidratos a las cadenas laterales de determinados aminoácidos. La mayoría de las BGL fúngicas son glicoproteínas, superándose en algunos casos el 70% (p/p) de carbohidrato en la molécula (Fadda *et al.*, 1994; Venturi *et al.*, 2002). La importancia de la porción carbohidratada en la función de las BGL es desconocida, aunque algunos estudios apuntan hacia una relación entre el grado de glicosilación y la termoestabilidad de la enzima (Eyzaguirre *et al.*, 2005). También parece contribuir a la secreción, a la estabilidad y a la inmunogenicidad de la proteína (Lee *et al.*, 2003).

En el caso de las BGL de *T. amestolkiae*, mediante el método de tinción de PAS se confirmó que las tres enzimas tienen una naturaleza glicoprotéica, ya que las bandas correspondientes se tiñeron de color rojo-púrpura, indicando que todas ellas contenían carbohidratos (Figura 4.12C). Estos



resultados indican que los valores de masa molecular y pI de las proteínas estarían afectados por la presencia de estos azúcares.

Para tratar de calcular el porcentaje y el tipo de glicosilación de las BGL de *T. amestolkiae* se realizaron experimentos de desglicosilación con enzimas comerciales que rompen enlaces N-glicosídicos (endo-H y PNGasa F) y O-glicosídicos (O-glicosidasa). Sin embargo, no se observaron diferencias en las masas moleculares antes y después del tratamiento cuando se analizaron por SDS-PAGE. La imposibilidad de desglicosilar las BGL tanto con N-glicosidasas como con O-glicosidasas indica que pueden estar O-glicosiladas, ya que este tipo de glicosilación es muy heterogénea y difiere mucho según la especie. Así, las O-glicosidasas comerciales suelen actuar de forma específica y sólo sobre determinados enlaces. Sin embargo, la N-glicosilación está muy conservada en la escala evolutiva, comenzando siempre con una asparagina y dos N-acetilglucosaminas que unen una cadena de manosas (Helenius y Aebi, 2004), y existen enzimas comerciales muy eficaces a la hora de hidrolizar este tipo de enlaces. Teniendo en cuenta nuestros resultados, todo indica que las BGL de *T. amestolkiae* son glicoproteínas cuyos azúcares están unidos por enlaces O-glicosídicos. La secuencia de aminoácidos de las BGL de *T. amestolkiae* ha permitido determinar los valores de masa molecular teóricos y compararlos con los obtenidos en la caracterización físico-química, pudiendo de esta manera estimar el grado de glicosilación de las enzimas (Apartado 4.4).

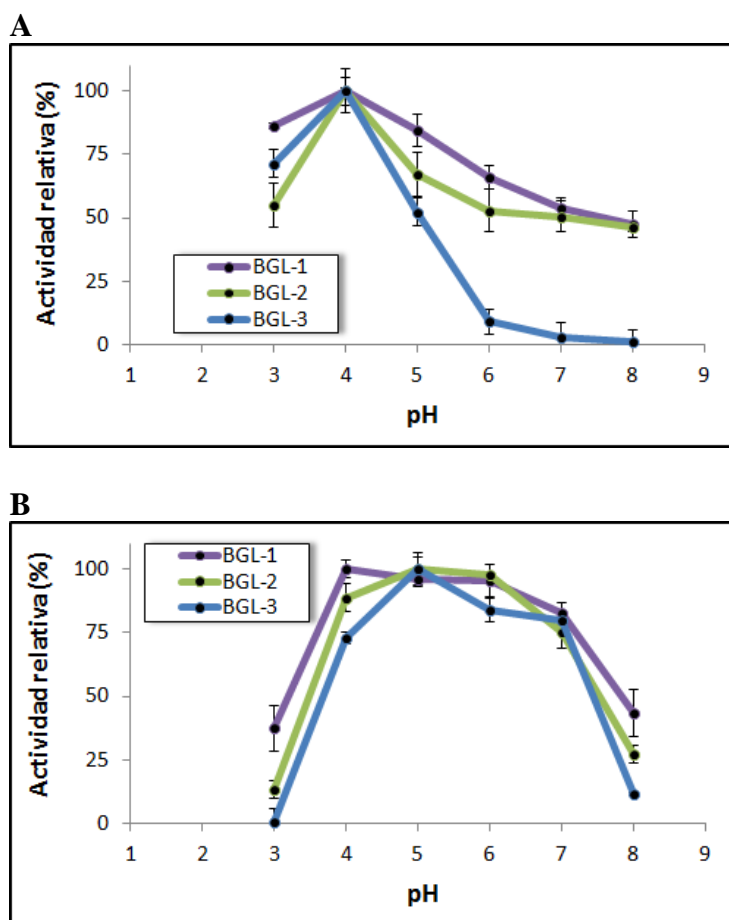
#### 4.3.3. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad

La temperatura y el pH son factores que influyen en la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica. Por esta razón, resulta conveniente analizar cómo afectan estos parámetros a las BGL de *T. amestolkiae*.

Para la estimación del pH óptimo de las BGL purificadas se midieron las actividades enzimáticas sobre *p*NPG, a temperatura ambiente, entre pH 3,0 y 8,0 (Apartado 3.9.7.1). La Figura 4.13A muestra que las tres BGL purificadas presentaron un pH óptimo de 4,0, como la mayoría de BGL fúngicas descritas (Eyzaguirre *et al.*, 2005). La principal diferencia entre ellas fue que BGL-1 y BGL-2 mostraron una actividad significativa a pH 7-8, aproximadamente la mitad que a pH óptimo, mientras que BGL-3 mostró una actividad muy baja a estos pH.

El estudio de la estabilidad a pH de las BGL purificadas (Figura 4.13B) se llevó a cabo tras 24 h de incubación a los distintos valores de pH (Apartado 3.9.7.2). Las tres BGL de *T. amestolkiae* fueron estables entre pH 4,0 y 7,0, disminuyendo notablemente su estabilidad por encima y por debajo de estos valores de pH. Este comportamiento es similar al descrito en otras

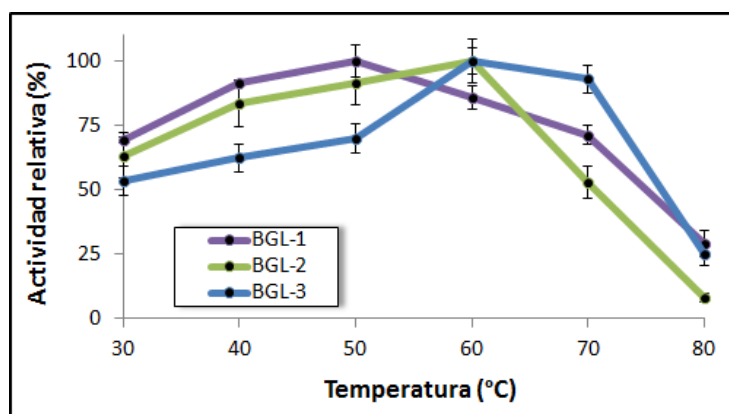
BGL de otras especies de *Penicillium* (Bhiri *et al.*, 2008; Karboune *et al.*, 2008; Krogh *et al.*, 2010; Ramani *et al.*, 2012).



**Figura 4.13.** pH óptimo (A) y estabilidad frente al pH (B) de BGL-1, BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae*.

Para estudiar la temperatura óptima de las BGL de *T. amestolkiae* se realizaron ensayos entre 30 °C y 80 °C (Apartado 3.9.7.3). La actividad detectada en las reacciones catalizadas por las tres enzimas a todas las temperaturas ensayadas fue de más del 50% de la actividad máxima (Figura 4.14), excepto a 80 °C. La actividad máxima para BGL-1 se obtuvo a 50 °C y para BGL-2 y BGL-3 fue a 60 °C. Estos datos también son similares a los reportados en varias especies del género *Penicillium* o *Talaromyces*, cuya máxima actividad se obtiene en ese rango de temperaturas (Bhiri *et al.*, 2008; Karboune *et al.*, 2008; Krogh *et al.*, 2010; Ramani *et al.*, 2012).

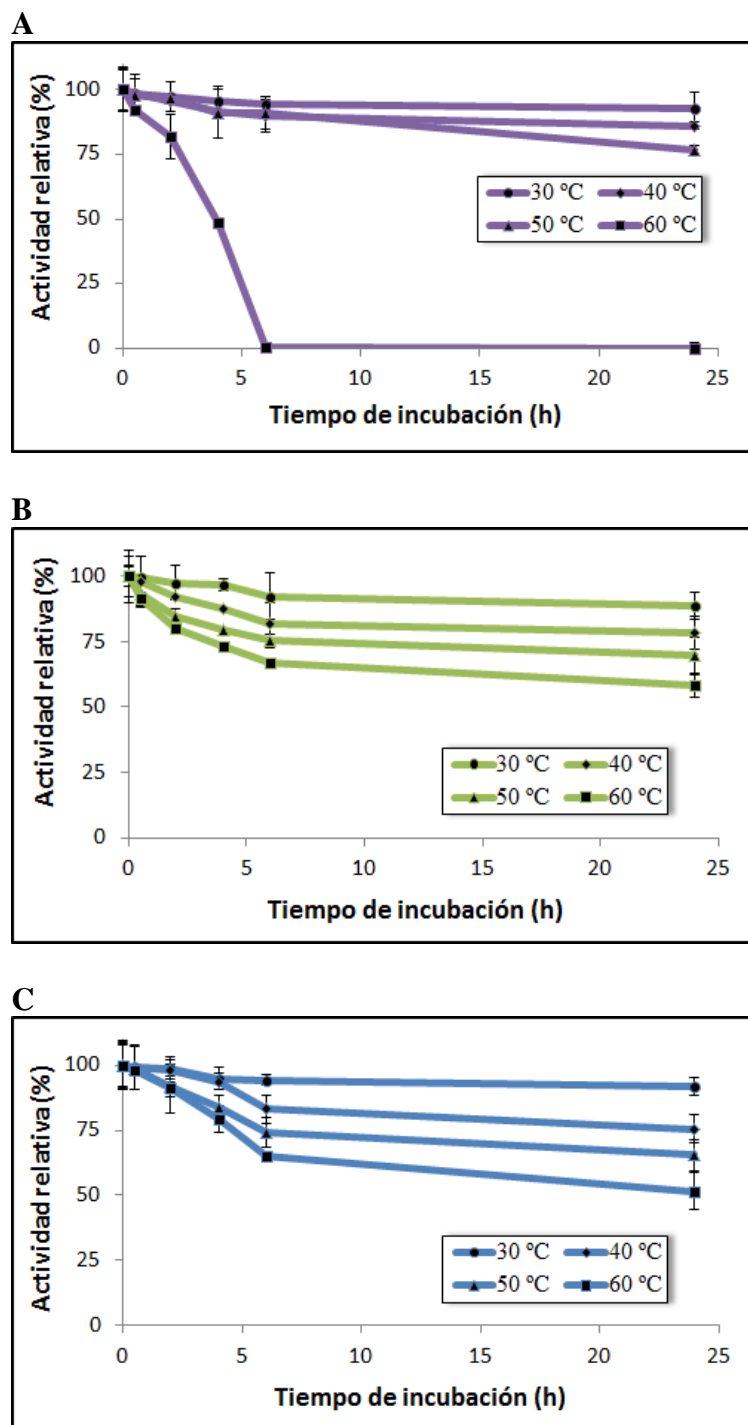




**Figura 4.14.** Temperatura óptima de BGL-1, BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae*.

El estudio de la estabilidad a la temperatura de las distintas BGL de *T. amestolkiae*, se llevó a cabo incubando las enzimas a 30, 40, 50 y 60 °C (Apartado 3.9.7.4). Las tres BGL mantuvieron aproximadamente la totalidad de su actividad a 30 °C después de 24 h de incubación, manteniendo también una actividad alta (70-90%) a 40 y 50 °C tras ese tiempo. La incubación de las enzimas a 60 °C puso de manifiesto que, aunque BGL-1 solo conservó el 50% de su actividad después de 4 h, desactivándose rápidamente trascurrido ese tiempo (Figura 4.15A), BGL-2 y BGL-3 tuvieron una pérdida de actividad menor durante las primeras horas, conservando más del 60% a las 4 h y manteniéndose estables tras 24 h (Figuras 3.15B y 3.15C).

En los procesos de sacarificación industrial, la termoestabilidad es una propiedad enzimática altamente deseable, ya que a temperaturas más altas se incrementa tanto la velocidad de reacción como la eficacia hidrolítica (Maheshwari *et al.*, 2000; Venturi *et al.*, 2002). Para mejorar este proceso, la búsqueda de BGL con alta termoestabilidad ha aumentado considerablemente en los últimos años (Viikari *et al.*, 2007). Aunque se han encontrado BGL termoestables, con frecuencia esta propiedad se mantiene durante un corto periodo de tiempo (Yeoman *et al.*, 2010). En el caso de los procesos de sacarificación industrial de la biomasa lignocelulósica, el proceso tiene lugar a 50 °C, con una duración de muchas horas (> 24 h) e incluso días. En este sentido, la estabilidad de las BGL de *T. amestolkiae* a esta temperatura puede ser una ventaja para aplicaciones de la biomasa lignocelulósica, como la producción de bioetanol 2G.



**Figura 4.15.** Estabilidad a la temperatura de BGL-1 (A), BGL-2 (B) y BGL-3 (C) de *T. amestolkiae*.

#### 4.3.4. Especificidad de sustrato

En base a su especificidad de sustrato, las BGL se dividen tradicionalmente en i) específicas de celobiosa, ii) específicas de aril-glicósidos y iii) con una amplia especificidad de sustrato (Rojas *et al.*, 1995). Las tres BGL de *T. amestolkiae* pertenecen al tercer grupo ya que mostraron una actividad significativa tanto por aril-glicósidos como por diferentes celooligosacáridos (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5.** Especificidad de sustrato de BGL-1, BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae* frente a aril-glicósidos y celooligosacáridos.

Sustrato (10 mM)	Actividad relativa (%)		
	BGL-1	BGL-2	BGL-3
<b>Aril-glicósidos</b>			
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido ( <i>p</i> NPG)	100	100	100
<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido	4,9 $\pm$ 0,5	9,4 $\pm$ 2,1	5,1 $\pm$ 1,8
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido	7,4 $\pm$ 2,6	15,3 $\pm$ 3,1	3,6 $\pm$ 0,8
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido	3,9 $\pm$ 0,7	9,4 $\pm$ 1,2	3,5 $\pm$ 0,8
<i>o</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido ( <i>o</i> NPG)	47,5 $\pm$ 2,5	62,3 $\pm$ 5,8	51,0 $\pm$ 6,7
<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -L-fucopiranosido	4,2 $\pm$ 1,1	6,8 $\pm$ 2,3	3,3 $\pm$ 0,7
<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido	1,7 $\pm$ 0,9	2,5 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,1
<b>Celooligosacáridos</b>			
Celobiosa	100	100	100
Celotriosa	82,7 $\pm$ 5,5	91,7 $\pm$ 0,5	90,0 $\pm$ 3,4
Celotetraosa	39,9 $\pm$ 7,6	65,0 $\pm$ 3,6	54,4 $\pm$ 5,6
Celopentaosa	15,0 $\pm$ 3,7	48,3 $\pm$ 4,7	16,7 $\pm$ 2,1
Celohexaosa	0,6 $\pm$ 0,2	23,3 $\pm$ 2,5	7,8 $\pm$ 2,2

Entre los diferentes aril-glicósidos ensayados (Tabla 4.5), las tres BGL de *T. amestolkiae* hidrolizaron con mayor eficacia el *p*NPG. Tomando este valor como referencia, las tres enzimas mostraron aproximadamente un 50% de actividad sobre *o*NPG, mientras que ninguna de ellas hidrolizó de forma significativa los sustratos en los que el azúcar fue distinto a glucosa o el carbono anomérico de éste estaba en posición  $\alpha$ , ni aquellos con la forma enantiomérica L.

En cuanto a la hidrólisis de celooligosacáridos, las tres BGL fueron capaces de hidrolizarlos (Tabla 4.5), disminuyendo la eficacia de forma proporcional al aumento de la longitud de la cadena. Estos resultados indican que estas enzimas pueden aplicarse en los pasos finales de la hidrólisis de la celulosa. Un patrón similar se ha observado con otras BGL fúngicas (Bhatia *et al.*, 2005; Parry *et al.*, 2001; Pitson *et al.*, 1997; Riou *et al.*, 1998; Saha y Bothast, 1996). Existen casos en los que la enzima ha podido degradar hasta celooctaosa (Christakopoulos *et al.*, 1994; Yazaki *et*

al., 1997). Sin embargo, los polímeros no son en general sustratos de estas enzimas (Bhatia *et al.*, 2002; Maheshwari *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2008), como hemos comprobado con las tres BGL de *T. amestolkiae*, que muestran una actividad muy baja (sobre laminarina y CMC) o nula (sobre Avicel, almidón y xilano) (datos no mostrados).

De las tres enzimas estudiadas, BGL-2 hidrolizó de forma más eficiente todos los sustratos ensayados, presentando valores de actividad máxima superiores a los de BGL-1 y BGL-3. De forma específica, BGL-2 actuó más eficientemente que BGL-1 y BGL-3 sobre celooligosacáridos de mayor longitud.

#### 4.3.5. Estudios cinéticos

Los parámetros cinéticos de la hidrólisis de *p*NPG y celobiosa, catalizada por las tres BGL purificadas de *T. amestolkiae*, se muestran en la [Tabla 4.6](#).

**Tabla 4.6.** Parámetros cinéticos de las BGL de *T. amestolkiae*.

	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
<b><i>p</i>NPG</b>				
<b>BGL-1</b>	1,57 ± 0,07	86,9 ± 5,5	90,7	57,8
<b>BGL-2</b>	0,09 ± 0,01	17,4 ± 2,1	28,2	313,3
<b>BGL-3</b>	0,29 ± 0,03	62,1 ± 3,8	221,5	763,8
<b>Celobiosa</b>				
<b>BGL-1</b>	2,24 ± 0,20	125,0 ± 4,9	130,4	58,2
<b>BGL-2</b>	0,73 ± 0,03	43,1 ± 1,7	69,8	95,6
<b>BGL-3</b>	1,48 ± 0,06	81,9 ± 2,9	292,1	197,4

En el cálculo de  $k_{cat}$  se utilizó el valor de masa molecular de la proteína obtenida mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF multiplicado por su grado de oligomerización.

Los valores de  $K_m$  revelaron que las tres BGL mostraron más afinidad por *p*NPG que por celobiosa, siendo BGL-2 la enzima que mostró mayor afinidad por ambos sustratos (0,09 mM y 0,73 mM, respectivamente). Plant y cols. (1988) sugirieron que la preferencia de las BGL con amplia especificidad de sustrato por el *p*NPG se debe a la alta electrofilia del aglicón, que potencia la estabilidad del anión *p*-nitrofenóxido generado durante el primer paso de la catálisis. En solo unos pocos casos estas enzimas muestran afinidades significativamente más altas por celobiosa, como las BGL de los hongos del rumen *Neocallimastix frontalis* (Li y Calza, 1991) y *Pyromices* sp. (Teunissen *et al.*, 1992). Los valores de  $K_m$  presentados por BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae* sobre *p*NPG son menores o del mismo orden que los reportados para otras BGL fúngicas, entre las que se encuentran las de *Thermoascus auranticus* (0,11 mM)

(Parry *et al.*, 2001), *Aspergillus oryzae* (0,29 mM) (Langston *et al.*, 2006), *T. reesei* (0,38 mM) (Chauve *et al.*, 2010) y *A. niger* (0,57 mM) (Chauve *et al.*, 2010) y de especies de *Penicillium* como *P. purpurogenum* (0,085 mM) (Hidalgo *et al.*, 1992), *P. brasilianum* (0,09 mM) (Krogh *et al.*, 2010) y *P. occitanis* (0,37 mM) (Bhiri *et al.*, 2008).

Debido a su naturaleza dimérica, los valores de eficacia catalítica ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) de BGL-3 son muy superiores a los de BGL-1 y BGL-2. Concretamente, los valores de  $k_{\text{cat}}/K_m$  de BGL-3 sobre pNPG son del mismo orden o mayores que los de algunas BGL diméricas, tales como las de *P. verruculosum* ( $4,59 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) (Chun *et al.*, 1991), *A. niger* ( $32,1 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) (Yan y Lin, 1996), *Paecilomyces thermophila* ( $48,1 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) (Yang *et al.*, 2008), *Stachybotris* sp. ( $818,5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) (Amouri y Gargouri, 2006) o la BGL JMB19063, descubierta tras un análisis metagenómico de compost ( $189,9 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) (McAndrew *et al.*, 2013).

#### 4.3.6. Efecto de varios compuestos sobre la actividad

Se estudió el efecto de varios iones metálicos sobre la actividad BGL de las enzimas purificadas (Tabla 4.7). Los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$  y los monovalentes  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Ag}^{+}$  y  $\text{Li}^{+}$  no influyeron significativamente sobre la actividad de las enzimas. Sin embargo, las tres BGL se inhibieron fuertemente en presencia de  $\text{Pb}^{2+}$ . Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  también inhibieron de forma acusada a BGL-1 y BGL-2, mientras que la inhibición resultó ser más leve en el caso de BGL-3.

En la Tabla 4.8 se muestra el efecto de varios agentes caotrópicos sobre la actividad BGL. Los detergentes SDS, Tween 80 y Triton X-100 inhibieron parcialmente la actividad BGL de las tres enzimas purificadas. Ninguna de ellas se vio afectada por el agente quelante EDTA, lo que indica que no son metaloproteínas. Tampoco tuvieron efecto los agentes reductores  $\beta$ -mercaptoetanol, DTT y L-cisteína, lo que sugiere que los grupos tioles de los puentes disulfuro, si poseen alguno, no son importantes para su actividad enzimática.

**Tabla 4.7.** Efecto de iones metálicos sobre las BGL de *T. amestolkiae*.

Cación (5 mM)	Actividad relativa (%)		
	BGL-1	BGL-2	BGL-3
Control	100	100	100
Ca <sup>2+</sup>	100,6 ± 1,5	89,6 ± 2,3	104,7 ± 3,8
Mg <sup>2+</sup>	105,6 ± 3,3	107,6 ± 5,8	108,8 ± 4,9
Cu <sup>2+</sup>	44,4 ± 2,1	45,9 ± 2,9	66,1 ± 5,1
Hg <sup>2+</sup>	10,4 ± 0,5	8,1 ± 0,3	68,9 ± 2,5
K <sup>+</sup>	108,9 ± 3,8	86,6 ± 2,7	79,8 ± 3,7
Zn <sup>2+</sup>	106,5 ± 7,1	90,8 ± 1,3	68,9 ± 3,2
Mn <sup>2+</sup>	102,6 ± 3,1	84,6 ± 3,9	101,8 ± 4,9
Fe <sup>3+</sup>	31,6 ± 2,5	42,2 ± 3,6	69,3 ± 5,7
Fe <sup>2+</sup>	23,2 ± 1,6	24,9 ± 3,0	58,2 ± 2,3
Co <sup>2+</sup>	92,3 ± 1,3	80,0 ± 6,0	102,3 ± 5,8
Ag <sup>+</sup>	98,4 ± 4,7	87,1 ± 2,5	95,6 ± 4,7
Pb <sup>2+</sup>	17,9 ± 3,2	42,9 ± 2,1	34,2 ± 2,1
Ni <sup>2+</sup>	97,8 ± 1,4	95,5 ± 2,4	92,0 ± 7,6
Li <sup>+</sup>	94,2 ± 1,1	92,9 ± 6,2	84,2 ± 4,3
Ba <sup>2+</sup>	96,6 ± 0,9	90,8 ± 3,3	106,2 ± 2,7

**Tabla 4.8.** Efecto de agentes caotrópicos sobre las BGL de *T. amestolkiae*.

Compuesto 0,1% (p/v)	Actividad relativa (%)		
	BGL-1	BGL-2	BGL-3
Control	100	100	100
β-mercaptoetanol	103,0 ± 7,3	106,6 ± 4,5	101,1 ± 4,6
Triton X-100	72,3 ± 3,4	71,4 ± 5,8	82,1 ± 6,3
EDTA	108,3 ± 6,0	104,2 ± 3,3	118,3 ± 7,4
SDS	68,2 ± 3,2	87,1 ± 2,5	90,6 ± 4,1
DTT	111,0 ± 5,5	95,6 ± 1,5	112,6 ± 2,2
Tween 80	85,0 ± 2,4	90,3 ± 2,9	87,4 ± 3,9
L-Cisteína	100,4 ± 3,3	98,6 ± 3,5	99,5 ± 2,4

Además se determinó el efecto de diversos monosacáridos sobre la actividad enzimática de las tres BGL de *T. amestolkiae* por su importancia en posibles aplicaciones de la biomasa vegetal (Tabla 4.9). Xilosa, arabinosa, galactosa, fructosa y manosa son los principales monosacáridos liberados en la fracción rica en hemicelulosa tras el pretratamiento con *steam explosion* (Dashtban *et al.*, 2009). A menudo esta fracción suele añadirse en la etapa de hidrólisis de la celulosa junto al *slurry* para aumentar la concentración final de azúcares y, por lo tanto, minimizar el coste del proceso global de bioconversión. Sin embargo, la mayoría de BGL empleadas actualmente son fuertemente inhibidas por monosacáridos.

Los resultados revelaron que la presencia de glucosa, el producto final de la hidrólisis de la celulosa, afecta negativamente a la actividad BGL, siendo menos fuerte la inhibición en el caso de BGL-1. Para el resto de monosacáridos analizados, los niveles de inhibición fueron menores del 30% a las concentraciones ensayadas. Así, las BGL de *T. amestolkiae* se unen al escaso grupo de BGL resistentes a la inhibición por azúcares (Wada *et al.*, 2010).

**Tabla 4.9.** Efecto de monosacáridos sobre las BGL de *T. amestolkiae*.

Monosacárido (1 mg/mL)	Actividad BGL relativa (%)		
	BGL-1	BGL-2	BGL-3
Control	100	100	100
Glucosa	72,9 ± 2,6	40,0 ± 1,9	45,1 ± 1,6
Arabinosa	95,2 ± 2,2	78,7 ± 4,2	86,1 ± 3,5
Xilosa	97,4 ± 0,8	84,54 ± 2,4	95,3 ± 5,2
Galactosa	93,3 ± 3,1	83,7 ± 3,7	99,0 ± 6,1
Fructosa	98,7 ± 2,7	90,8 ± 1,6	91,6 ± 0,9
Manosa	87,3 ± 2,8	96,1 ± 3,2	89,8 ± 3,3

#### 4.3.7. Inhibición por glucosa y $\delta$ -gluconolactona

La inhibición por producto de reacción es un fenómeno común en las BGL. El principal inhibidor de estas enzimas es la glucosa, producto final de la hidrólisis de la celulosa, por lo que se considera que las BGL son las enzimas limitantes de este proceso (Berlin *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2004). La  $\delta$ -gluconolactona ( $\delta$ -Gl), un análogo oxidado de la glucosa, es también un potente inhibidor de las BGL microbianas (Harhangi *et al.*, 2002).

El análisis de la actividad de las tres BGL de *T. amestolkiae* sobre pNPG, en presencia de glucosa y  $\delta$ -Gl, mostró que existe inhibición competitiva de las tres enzimas por ambos compuestos. Los valores de la constante de inhibición ( $K_i$ ) (Tabla 4.10) revelaron que glucosa y  $\delta$ -Gl tuvieron un efecto similar sobre BGL-1, BGL-2 y BGL-3, aunque BGL-1 es la enzima menos susceptible.

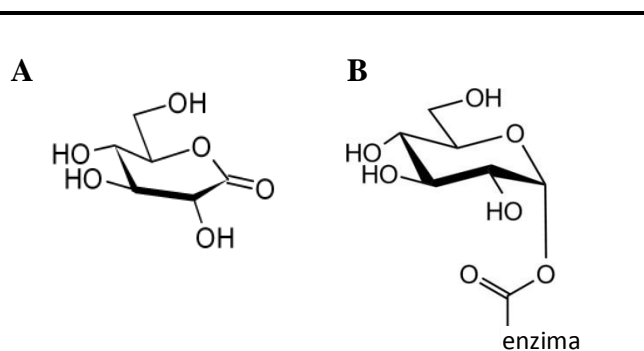
**Tabla 4.10.**  $K_i$  (mM) de BGL-1, BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae*.

Enzima	Glucosa	$\delta$ -Gl
BGL-1	3,12 ± 0,29	3,25 ± 0,63
BGL-2	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,03
BGL-3	0,18 ± 0,07	0,24 ± 0,08



La mayoría de las BGL de microorganismos reportadas hasta la fecha son inhibidas competitivamente por glucosa y exhiben valores de  $K_i$  desde 0,2 mM hasta 100 mM (Harhangi *et al.*, 2002; Karnchanatat *et al.*, 2007; Mamma *et al.*, 2004; Parry *et al.*, 2001). Las BGL glucotolerantes proceden en su mayoría de hongos del género *Aspergillus* (3-14 mM) (Harhangi *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 1992).

Al igual que otras BGL fúngicas, las BGL de *T. amestolkiae* fueron inhibidas competitivamente por  $\delta$ -GL (Parry *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2008). Los valores de  $K_i$  reportados para este compuesto varían desde 0,0083  $\mu$ M hasta 12,5 mM (Eyzaguirre *et al.*, 2005). La inhibición por  $\delta$ -GL se ha explicado por similitudes estéricas entre la lactona y el compuesto intermedio glicosil-enzima formado en la hidrólisis del enlace glicosídico (Hoh *et al.*, 1992; Iwashita *et al.*, 1998) (Figura 4.16).

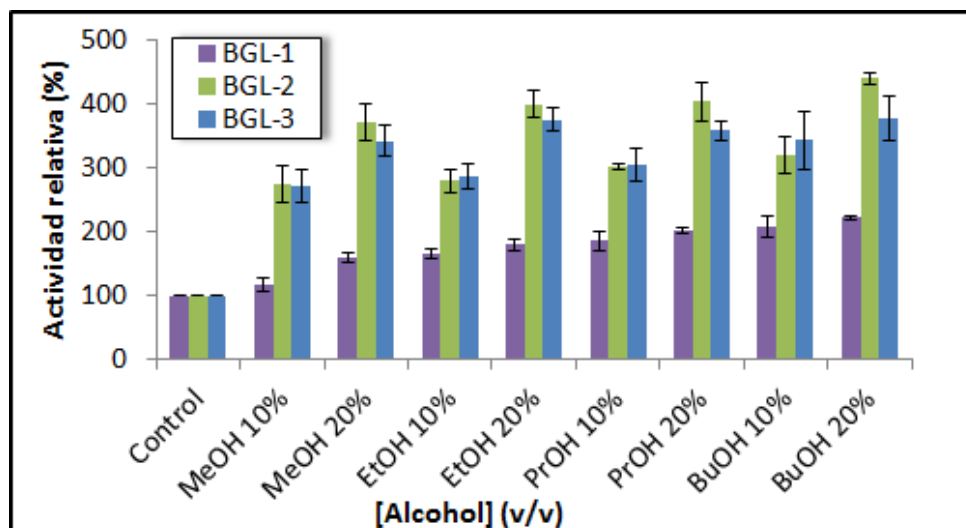


**Figura 4.16.** Estructuras de  $\delta$ -GL (A) y el intermedio glicosil-enzima (B).

#### 4.3.8. Reacciones de transglicosilación

Además de participar en la sacarificación de la celulosa mediante su potencial hidrolítico, las BGL pueden catalizar reacciones de transglicosilación, lo que permite su empleo en otras aplicaciones biotecnológicas. Este tipo de reacciones tienen lugar en presencia de un segundo nucleófilo más fuerte que el agua, como un alcohol (Tsitsimpikou *et al.*, 1997). En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de MeOH, EtOH, PrOH y BuOH en la actividad hidrolítica de las BGL de *T. amestolkiae* sobre pNPG (Figura 4.17). En todos los casos la velocidad máxima de la reacción aumentó, ya que el alcohol actúa como un aceptor más eficiente que el agua, lo que provoca un aumento de la velocidad de liberación de pNP (Gueguen *et al.*, 1995). Se ha reportado que el cambio en la polaridad del medio inducido por los alcoholes podría estabilizar la conformación de la enzima (Mateo y DiStefano, 1997).





**Figura 4.17.** Efecto de alcoholes alifáticos sobre las BGL de *T. amestolkiae*.

Con objeto de optimizar las condiciones de transglicosilación se ensayaron distintas concentraciones de los alcoholes utilizados. En todos los casos, la concentración óptima fue 20% (v/v). A concentraciones superiores (30 y 40%), la activación disminuyó, probablemente debido a la desnaturalización provocada por los propios alcoholes (datos no mostrados). La activación por alcoholes se ha observado en BGL de *T. auranticus* (Parry *et al.*, 2001), *A. oryzae* (Riou *et al.*, 1998) y *Fusarium oxysporum* (Christakopoulos *et al.*, 1994).

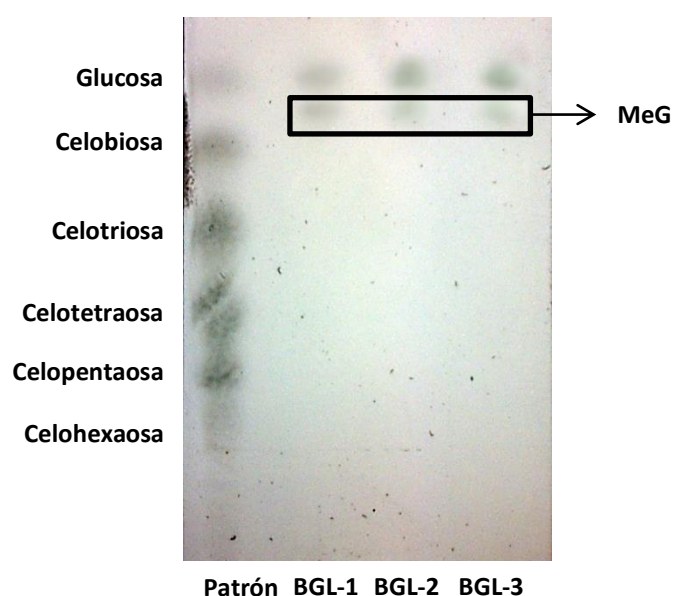
Krogh y cols. (2010) describieron que en las reacciones de transglicosilación, los grupos hidroxilos presentes tanto en alcoholes como en azúcares pueden actuar como aceptores glicosídicos, pudiéndose formar alquilglicósidos y oligosacáridos, respectivamente. A continuación se muestran los resultados obtenidos para la síntesis de estos compuestos empleando las BGL de *T. amestolkiae*.

#### 4.3.8.1. Síntesis de alquilglicósidos

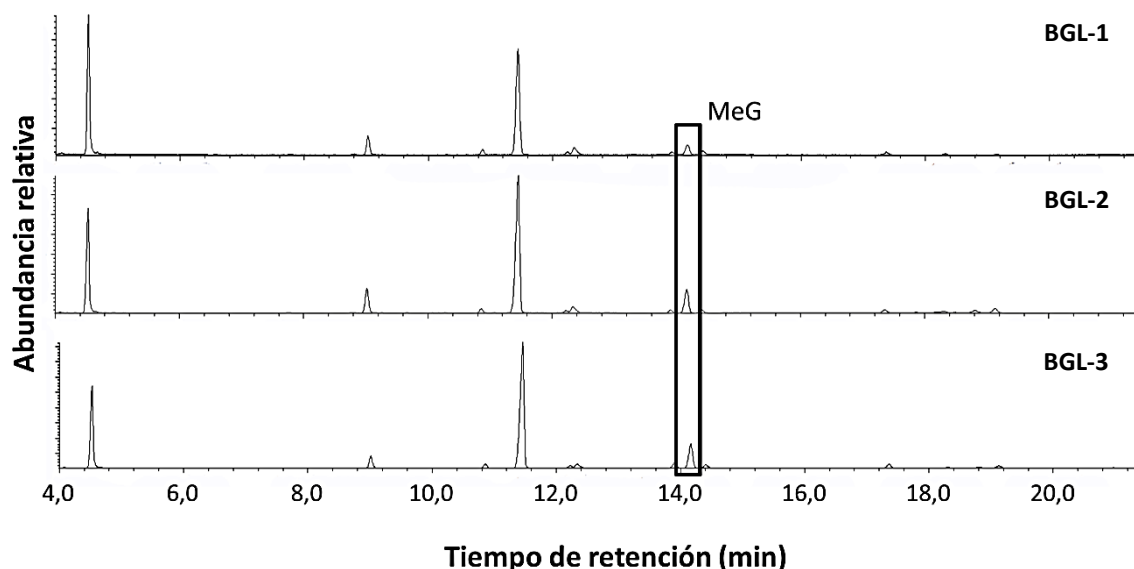
Existen distintas estrategias para favorecer la obtención de alquilglicósidos de interés a través de reacciones de transglicosilación. Una de ellas es el empleo de donadores glicosídicos muy reactivos (aril-glicósidos), que se hidrolizan más rápido que los productos formados (Andreotti *et al.*, 2006). Otras estrategias se basan en aumentar la concentración de donador y aceptor. En este trabajo se usó *p*NPG a una concentración de 6 mM, el doble que la utilizada en ensayos de hidrólisis (Apartado 3.9.10.1). Al tratarse del reactivo limitante, un incremento en su concentración aumenta la cantidad de glucósido formado. Como aceptores glicosídicos se

utilizaron los alcoholes alifáticos ensayados en el apartado anterior. Inicialmente, las reacciones se llevaron a cabo a 50 °C en tampón citrato a pH 5 y MeOH 20% (v/v) como aceptor. Después de 1 h de reacción, el análisis por CCF reveló la formación de glucosa, como producto de la hidrólisis, y metilglucósido (MeG), como producto de la transglicosilación, con las tres BGL de *T. amestolkiae* (Figura 4.18).

Para confirmar este resultado se analizaron las reacciones por CG/EM (Figura 4.19). La identificación de los compuestos de la reacción se realizó en base a los tiempos de retención ( $t_R$ ) de reactivos y productos, que se inyectaron como patrones: *p*NPG (4,5 min), citrato (11,4 min), glucosa (13,9 min) y MeG (14,2 min). Como muestra la Figura 4.19, las tres BGL de *T. amestolkiae* fueron capaces de sintetizar MeG como producto de las reacciones de transglicosilación en las condiciones empleadas. Tras confirmarse la capacidad del MeOH para aceptar el glicósido procedente de la hidrólisis del *p*NPG se ensayaron el resto de alcoholes de mayor longitud, para comprobar si las enzimas podían catalizar también la síntesis de etilglucósido (EtG), propilglucósido (PrG) y butilglucósido (BuG). Aunque en este caso no se disponía de los productos de la reacción, en todos los ensayos aparecieron picos con  $t_R$  mayores que el observado para MeG, que podrían corresponder a EtG (15,6 min), PrG (18,1 min) y BuG (20,8 min) (datos no mostrados).



**Figura 4.18.** Análisis por CCF de los productos de las reacciones de transglicosilación por BGL-1, BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae* usando *p*NPG y MeOH, tras 1 h de reacción. El compuesto formado (MeG) se señala en el recuadro.



**Figura 4.19.** Análisis por CG/EM de los productos de las reacciones de transglicosilación por BGL-1, BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae* con *p*NPG y MeOH, tras 1 h de reacción. El compuesto formado (MeG) se señala en el recuadro.

Las reacciones de transglicosilación utilizando *p*NPG como donador glicosídico tienen lugar en dos pasos (Figura 1.9). En el primero de ellos se forma el compuesto intermedio glicosil-enzima y se libera *p*NP. La enzima libre se regenera con la transferencia de la unidad de glucosa hacia un aceptor glicosídico, en este caso el alcohol. El alquilglicósido formado puede actuar, a su vez, como dador glicosídico, permitiendo la posibilidad de una reacción de hidrólisis secundaria. Además, el *p*NPG podría funcionar como aceptor glicosídico, formándose *p*NP-celobiosa, un producto indeseable pero común en las reacciones secundarias durante la transglicosilación (Feng *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2010). Esto reduciría el rendimiento del glicósido, por lo que es fundamental un control estricto de los tiempos de reacción.

En este trabajo se ha formado BuG como mayor alquilglicósido porque BuOH fue el alcohol de cadena más larga utilizado. Basso y cols. (2002) sintetizaron octilglucósido (C<sub>8</sub>) con una BGL de almendra, mientras que Chandra y cols. (2013) obtuvieron geranilglucósido a partir de geraniol (C<sub>10</sub>) con una BGL del hongo *Trichoderma citrinoviride*. Sin embargo, estas enzimas fueron capaces de utilizar sólo esos alcoholes como donadores de entre todos los que ensayaron, a diferencia de las tres BGL de *T. amestolkiae*, que mostraron una amplia especificidad de aceptores. En la Tabla 4.11 se muestra un resumen de los trabajos en los que se ha evaluado la actividad de transglicosilación de BGL de diversos microorganismos para la síntesis de alquilglicósidos utilizando diferentes sustratos. La

versatilidad de las BGL de *T. amestolkiae*, en cuanto al empleo de diferentes alcoholes como aceptores glicosídicos, es prometedora. El efecto en la actividad de alcoholes de cadena más larga está siendo actualmente evaluado.

**Tabla 4.11.** Síntesis de alquilglucósidos mediante transglicosilación por diferentes BGL microbianas.

Fuente de la enzima	Dador glicosílico	Aceptor glicosílico	Producto	Tiempo (h)	Referencia
<i>A. niger</i>	Celobiosa	MeOH EtOH	MeG EtG	0,5	(Yan y Liau, 1998)
<i>F. oxysporum</i>	Celobiosa Gentiobiosa Amigdalina Arbutina Salicina pNPG	MeOH	MeG	10	(Makropoulou <i>et al.</i> , 1998)
<i>A. niger</i>	Celobiosa	MeOH EtOH	MeG EtG	6 3	(Yan <i>et al.</i> , 1998)
<i>Penicillium canescens</i>	Lactosa	Heptanol Octanol Nonanol	Heptilglucósido Octilglucósido Nonilglucósido	80	(Kouptsova <i>et al.</i> , 2001)
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Lactosa	Hexanol Octanol	Hexilglucósido Octilglucósido	3 20	(Das-Bradoo <i>et al.</i> , 2004)
<i>Thermotoga neapolitana</i>	pNPG	Hexanol	Hexilglucósido	3	(Turner <i>et al.</i> , 2007b)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	pNPG	Hexanol	Hexilglucósido	12	(Ito <i>et al.</i> , 2007)
<i>T. citrinoviride</i>	pNPG	Geraniol	Geranilglucósido	18	(Chandra <i>et al.</i> , 2013)
<i>T. amestolkiae</i>	pNPG	MeOH EtOH PrOH BuOH	MeG EtG PrG BuG	1	Este trabajo

#### 4.3.8.2. Síntesis de celooligosacáridos

La síntesis de celooligosacáridos por transglicosilación se estudió utilizando celobiosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa o celohexaosa , en cada caso como donador y aceptor simultáneos, a una concentración de 40 mg/mL (cuatro veces mayor que la usada en los ensayos de hidrólisis (Apartado 3.9.10.2)).

Inicialmente, las muestras se analizaron por CCF, observándose en todos los casos la aparición de bandas correspondientes a los nuevos celooligosacáridos formados tras 1 h de reacción. Con el fin de identificarlos, se analizaron las reacciones por MALDI-TOF/TOF para

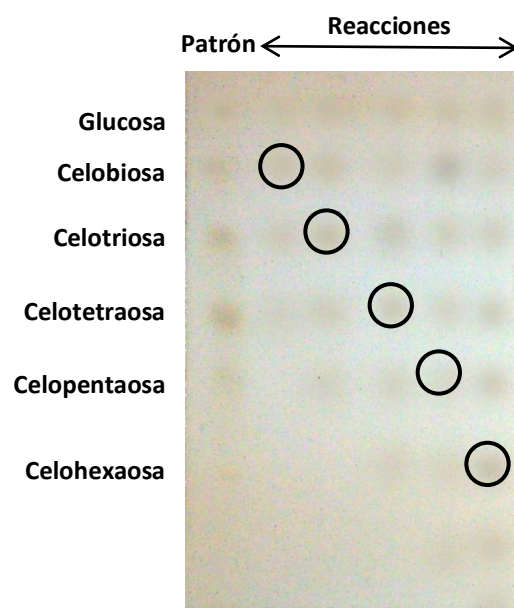
conocer los valores de masa molecular exactos de los productos. En la [Tabla 4.12](#) se muestran los valores de  $m/z$  correspondientes a los celooligosacáridos usados como patrón, tras su ionización con sodio.

**Tabla 4.12.** Valores  $m/z$  esperados para los iones de los celooligosacáridos detectados por MALDI-TOF/TOF.

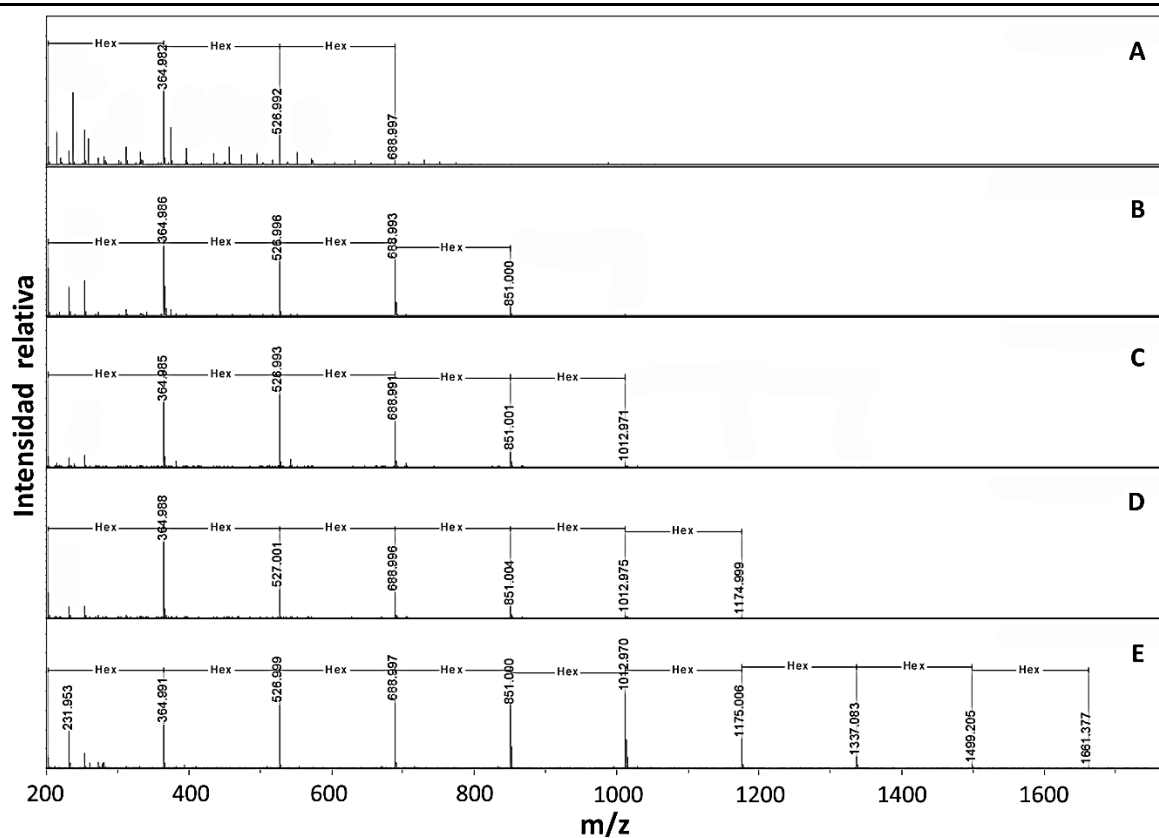
Nº de carbonos	Oligosacárido	$m/z + [Na^+]$
2	celobiosa	365
3	celotriosa	527
4	celotetraosa	689
5	celopentaosa	851
6	celohexaosa	1013
7	celoheptaosa	1175
8	celooctaosa	1337
9	celononaosa	1499
10	celodecaosa	1661
11	celoundecaosa	1823
12	celododecaosa	1985
13	celotridecaosa	2147

Como ocurrió en el apartado anterior, se detectó la formación de los productos procedentes de la transglicosilación a partir de celooligosacáridos mediante CCF ([Figura 4.20](#)), siguiendo un patrón similar al producido por las BGL de los hongos *T. auranticus* ([Parry et al., 2001](#)) y *P. thermophila* ([Yang et al., 2008](#)). Los resultados con las BGL de *T. amestolkiae* indican que a medida que se aumenta el tamaño del sustrato de partida, se forma un celooligosacárido mayor como producto. Mediante MALDI-TOF/TOF se analizó el patrón de transglicosilación de las BGL. Con la enzima BGL-1 se formó celotetraosa a partir de celobiosa y celodecaosa a partir del hexámero de glucosa ([Figura 4.21](#)). En las mismas condiciones, BGL-2 operó de la misma forma, mientras que con BGL-3 solo se pudo llegar a formar celooctaosa a partir de celohexaosa (datos no mostrados). Así, desde un punto de vista cualitativo BGL-1 y BGL-2 son más interesantes ya que llegaron a formar celodecaosa, el oligosacárido con mayor grado de polimerización obtenido hasta la fecha vía transglicosilación ([He et al., 2013](#); [Park et al., 2005](#); [Yang et al., 2008](#)).

Nuestros resultados sugieren que hidrólisis y transglicosilación son fenómenos que suceden de forma simultánea y que es preciso controlar las condiciones de reacción en función de los productos deseados.



**Figura 4.20.** Análisis por CCF de los productos de la reacción de transglucosilación por BGL-1 de *T. amestolkiae*, tras 1 h de reacción a partir de celooligosacáridos, señalados en círculos.



**Figura 4.21.** Análisis por MALDI-TOF/TOF de los productos de la reacción de transglucosilación por BGL-1 de *T. amestolkiae*, tras 1 h de reacción a partir de celobiosa (A), celotriosa (B), celotetraosa (C), celopentaosa (D) y celohexaosa (E).

## 4.4.SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS BGL DE *T. amestolkiae*

### 4.4.1. Identificación de péptidos internos

Con el fin de comprobar si las tres BGL de *T. amestolkiae* eran diferentes isoenzimas o la misma proteína con diferente grado de glicosilación, se determinaron sus huellas peptídicas. El análisis de los péptidos obtenidos, tras la digestión con tripsina se realizó por MALDI-TOF y se cotejaron con los encontrados en la base de datos NCBI. En las [Tablas 3.13-3.15](#) se muestran las secuencias de péptidos obtenidas para las tres BGL y su homología con otras BGL fúngicas.

Los péptidos trípticos que presentaron mejor grado de similitud encontrados en la huella peptídica de BGL-1 presentaron alta homología con aquéllos encontrados en BGL de la familia GH1 de *T. stipitatus* ATCC 10500 (XP\_002486552), *P. marneffeii* ATCC 18224 (XP\_002152823) y *P. tritici-repentis* Pt-1C-BFP (XP\_001940405). Para BGL-2, se obtuvieron péptidos internos idénticos a los encontrados en dos BGL de la familia GH3 de *T. stipitatus* ATCC 10500 (XP\_002485128) y *P. marneffeii* ATCC 18224 (XP\_002149046). Para BGL-3, por su parte, se encontraron péptidos idénticos a otras BGL de la familia GH3 de *T. aculeatus* (AGA96121), *T. purpurogenus* (ACV87737), *T. funiculosus* (AFU91382) y *T. stipitatus* ATCC 10500 (XP\_002480480).

Los diferentes péptidos encontrados en las tres BGL de *T. amestolkiae* sugerían que se trataba de tres proteínas diferentes. En todos los casos, las proteínas que presentaron mayor homología eran de hongos relacionados filogenéticamente con el género *Talaromyces* ([Figura 4.4](#)).

**Tabla 4.13.** Péptidos obtenidos en el análisis de la huella peptídica de BGL-1 de *T. amestolkiae* mediante MALDI-TOF.

Secuencia péptido	Especie	Nº Acceso	Anotación	Similitud
ILFTHFADR	<i>T. stipitatus</i>	XP_002486552	BGL	245
YYSFSISWGR	ATCC 10500		GH1	
DLVDQLYDSPR				
SQSYVYITPTYLR				
ILFTHFADR*	<i>P. marneffeii</i>	XP_002152823	BGL	158
YYSFSISWGR*	ATCC 18224		GH1	
DLVDQLYDSPR*				
ILMTHFADR*	<i>P. tritici-repentis</i>	XP_001940405	BGL	102
AQKDQEFDSPR	Pt-1C-BFP		GH1	

\*Péptido repetido en el organismo anterior.



**Tabla 4.14.** Péptidos obtenidos en el análisis de la huella peptídica de BGL-2 de *T. amestolkiae* mediante MALDI-TOF.

Secuencia péptido	Especie	Nº Acceso	Anotación	Similitud
AISSGQVAQSR	<i>P. marneffei</i>	XP_002149046	BGL	297
HFDQSNIQPR	ATCC 18224		GH3	
RDLSYWDV				
LSLAAGASGTATFDLTR				
WVVPSTGAFTIYVGASSR				
TLHELYLWPFADAVR				
RDLSYWDV*	<i>T. stipitatus</i>	XP_002485128	BGL	81
TLHELYLWPFADAVR*	ATCC 10500		GH3	

\*Péptido repetido en el organismo anterior.

**Tabla 4.15.** Péptidos obtenidos en el análisis de la huella peptídica de BGL-3 de *T. amestolkiae* mediante MALDI-TOF.

Secuencia péptido	Especie	Nº Acceso	Anotación	Similitud
TPFTWGK	<i>T. aculeatus</i>	AGA96121	BGL	148
EINQHVVDVR			GH3	
NVDGALPLTGSR				
SLCMQDSPLGVR				
HYIGNEQEHR				
GVDVQLGPVAGPLGR				
GKGVDVQLGPVAGPLGR				
EAQWTATLTR				
LGFRSLCMQDSPLGVR				
FVAVFGEDAGSNPDGVNGCSDR				
DTDYNTAFPAGVNVAATWDLDLAYR				
TPFTWGK*	<i>T. purpurogenus</i>	ACV87737	BGL	113
EINQHVVDVR*			GH3	
SLCMQDSPLGVR*				
HYIGNEQEHR*				
GVDVQLGPVAGPLGR*				
GKGVDVQLGPVAGPLGR*				
LGFRSLCMQDSPLGVR*				
FVAVFGEDAGSNPDGVNGCSDR*				
DTDYNTAFPAGVNVAATWDLDLAYR*				
TPFTWGK*				
EINQHVVDVR*	<i>T. funiculosus</i>	AFU91382	BGL	113
SLCMQDSPLGVR*			GH3	
HYIGNEQEHR*				
GVDVQLGPVAGPLGR*				
GKGVDVQLGPVAGPLGR*				
LGFRSLCMQDSPLGVR*				
FVAVFGEDAGSNPDGVNGCSDR*				
DTDYNTAFPAGVNVAATWDLDLAYR*				
TPFTWGK*	<i>T. stipitatus</i>	XP_0024804	BGL	83
QINEHVVDVR	ATCC 10500	80	GH3	
SLCMQDSPLGVR*				
GVDVQLGPVAGPLGR*				
GKGVDVQLGPVAGPLGR*				
LGFRSLCMQDSPLGVR*				
FVAVFGEDAGSNPDGVNGCSDR*				
NWEGFAPDPVLTGQ				

\*Péptido repetido en el organismo anterior.



#### 4.4.2. Determinación y análisis de las secuencias nucleotídicas

Las secuencias de los péptidos internos obtenidos en el análisis de la huella peptídica se utilizaron para diseñar oligonucleótidos para secuenciar las BGL de *T. amestolkiae*. Comparándolas con las existentes en las bases de datos, se encontraron BGL fúngicas con péptidos similares y se obtuvieron las secuencias nucleotídicas que las codificaban. Alineamientos de estas secuencias mostraron zonas conservadas que sirvieron como molde para el diseño de cebadores degenerados, específicos para cada una de las BGL (Tabla 3.21). Utilizando el ADN genómico de *T. amestolkiae* y estos cebadores, se amplificaron regiones internas de los genes que codifican las BGL, que permitieron diseñar nuevos cebadores para completar su secuenciación. Las secuencias de ADN obtenidas se compararon con las secuencias de ARNm teóricas de las BGL encontradas en las bases de datos y, de esta forma, se llevó a cabo una predicción de la región codificante de las BGL de *T. amestolkiae*. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

##### 4.4.2.1. BGL-1

Usando los cebadores degenerados BGL-1Fw5' y BGL-1Rv3', se obtuvo *bgl-1* sin su péptido señal (Figura 4.22). En base a un fragmento intermedio del gen se diseñó el cebador reverso BGL-1Rv1341, con el que se secuenció completamente *bgl-1*. Esta secuencia contiene 1861 pb y su análisis reveló una alta identidad (80-85%) con los genes de una BGL de *T. stipitatus* ATCC 10500 (XM\_002486507) y de una BGL de *P. marneffe* ATCC 18224 (XM\_002152787), a partir de los cuales se diseñaron los cebadores para amplificarlo. La secuencia obtenida se depositó en GenBank con el número de acceso KM393204. El alineamiento de la secuencia obtenida con las secuencias de los ARNm predichos de las BGL de los hongos mencionados anteriormente, sugirió que la región codificante de *bgl-1* de *T. amestolkiae* presentaba dos posibles intrones (subrayados en la Figura 4.22) y constaba de 1777 pb.

Tras eliminar los intrones predichos, se encontró un marco de lectura completo, cuya traducción resultó en 591 aminoácidos, sugiriendo que la proteína BGL-1 de *T. amestolkiae* debería tener una masa molecular teórica de 66,7 kDa y un pI de 4,8. Sin embargo, estos valores difieren significativamente de los valores obtenidos tras la purificación de esta enzima (62,6 kDa y pI 6,5, Apartado 4.4.1). La diferencia en el pI podría explicarse por la glicosilación de la proteína (Apartado 4.4.2), ya que la presencia de azúcares modifican su carga. Sin embargo, la menor masa molecular de BGL-1, calculada por MALDI-TOF, sugiere que la secuencia de su ARNm es menor que la predicha. Esto podría deberse a la presencia

de un intrón adicional no anotado en las secuencias de las BGL XM\_002486507 y XM\_002152787 depositadas en las bases de datos.

**BGL-1Fw5'**

```

1  CAGGAGCTGT ATATCACGAC GACTGGCTAC ACGGCGCGGC CACAATGCAC TGAACCCCA GCTACGCCAA
71  CTTTTCGCTT CCAGTCGTTT TCATATGCAT CGCTCAACGA TACAATTCGG TGTGTTGTTT TCTTCTGTCG
141 TACAATTTCC AATTAACACT CGCAGCTATG CAATCTCAGT CCCCTCTCCA ACAACCACCC ACACCTACGG
211 ACCAGCATAC ACAGATGCAG TAGCAAACT GTCGACGAAG CTAACGACCA CGACGTGGGG TAGTTGGGTA
281 CCAAGTCAGA CCGTCATCTC TGCAACCGAT ACAGCGGACA AATACGGCCA AGCCGCGTGG TCATCGCAAT
351 GGCTACATGC AAGCTTGGCG AATTATACCA ATATTGGTTT GTATACGACC ACCGTCAATC CTACCCCAT
421 ACCTTCCAGT GAACTTGTTT TTCCACCACG AGACTATTTC GGTCCAACGG ATTGCTACAA CTTTCCGGAA
491 GGATTCACGT TCGGTGTTGC CGGATCTGCT GCTCAGATCG AAGGTGCTAT TGGCCTCGAA GGTCTGTCGC
561 CGAGTATACT GGAGAAATTG CTGCCAGATA CAGAACCACA GGATTACGTG ACAAATGAGA ACTACTACCT
631 GTATAAGCAG GACATTCAGC GTCTTGATC GATTGGCGTC AAGTATTACA GTTTCTCAAT CTCGTGGGGC
701 CGCATTCTAC CGTTCACCGT GCCCGGAAGC CCAATCAATG AACAAGGCCT CAAGCATTAC AATGACTTGA
771 TCGATTATGT TTTGGAAGTT GGCATGGTAC CTATTGTTAC GATGCTCCAC TTCGATACTC CACTGTATTT
841 CATCAATGCC TCTGCTGGTT ACGTGGTGCC GGATATTGGA TACCAGAATG GCGGGTATTG GAATAAAGAG
911 TTTGTCGATT CGTTTGTGAA TTACGGCAAG ATCTTGTTTA CGCATTTTGC CGATCGTGTC CCGTTCTGGG
981 TTACTATTAA TGAGCCCCTG CTGTATGCGT TTAATTTTAC AGGACTGGAT AATGTTGTGC ATGCCACGC
1051 AGAACTGTAT CACTTCTATC ATGATACTTT GAATGGAAGT GGAAAGGTGG GATTGAAATT GAACGACAAT
1121 TTTGGCGTGC CCAAGCACCC TGAGAACCAG ACCGAGATCG ATGCCGCCAA CCGTTTCAAT GACATGCAGC
1191 TCGGCGTCTT TCGGTATCCG ATTTGTCTCG GCCAGCAATA TCCTAAATCT ATTCTCGACA CTCTGCCAGG
1261 CGCCAAACCA CTCAGTAAAA AGGAATTGGA GTACATCAGC CATAACAACG ACTTCATCGG CATCGACGCA
1331 TATACAGCCA CCGTCATCTC CGTTCCTGCC GAAGGCATCG AATATTGCTC CAAACAGAAC ATGACCACCA
1401 ACTCCTTGTA TCCGTACTGC GTCACCCAAG AAACCGTAAA TTCATATGGC TGGGATATTG GCTACCGCTC
1471 TCAATCCTAC GTCTACATCA CACCCACCTA CCTCCGCGCA TTCCTGTCTT ATATCTGGAA CACCTACAAA
1541 ACGCCCCTCG TCCTCAGCGA ATTCGGTTTT CCCGTCTACG CTGAATCGAC TCGCGATTTA GTCGACCAAC
1611 TGTATGATTC ACCCCGAAGT CAATATTATC TCTCGTTCAT GTCCGAGGTA CTCAAATCGA TATGGGAGGA
1681 TGGGGTGGAT GTCATTGGGG CGATTGCGTG GAGCTTTATG GATAATTGGG AATTGGGGGA TTATGCGCAG
1751 CAATTTGGGA TGCAGGTTGT CAATCGGACG ACGCAGGAGA GGTGGTTTAA GAAGAGCTTT TTTGACATTG
1821 TGGATTTTGT GGGTCCGAGG AATGGTTTGG GGTGCTTAA

```

**BGL-1Rv1341**

**BGL-1Rv3'**

**Figura 4.22.** Secuencia nucleotídica del gen *bgl-1* de *T. amestolkiae*. Se indican los cebadores usados para su amplificación y secuenciación (encuadrados), los intrones predichos (subrayados con línea continua), el posible tercer intrón (sombreado en gris) y el codón de parada (rojo).

Comparando la secuencia proteica deducida con las encontradas en las bases de datos mediante BLAST, se encontró una gran homología (88-92%) con las BGL anotadas automáticamente a partir de los genomas de los hongos *T. stipitatus* ATCC 10500 (XM\_002485083) y *P. marneffe* ATCC 18224 (XM\_002149010), así como con las de hongos menos relacionados del género *Aspergillus*. En el caso de la BGL predicha del genoma de *Aspergillus nidulans* FGSC A4 (XP\_682452), con la que presenta una identidad de secuencia del 68%, aparece una delección de 36 aminoácidos hacia el extremo N-terminal de la proteína (residuos 40-76).

Teniendo en cuenta que *A. nidulans* es uno de los organismos modelo más importantes, cuyo genoma se ha revisado en varias ocasiones (Wortman *et al.*, 2009), este fragmento podría corresponderse con el tercer intrón y justificar la diferencia de masa molecular de 4 kDa observada entre el valor teórico y el observado por MALDI-TOF. Estos aminoácidos corresponderían con las bases 171-277 de la secuencia nucleotídica (señalado en Figura 4.23). En estudios futuros se procederá a obtener la secuencia completa, a partir de ADNc, para conocer con exactitud los intrones del gen *bgl-1*.

---

```

1  QELYITTTGY TARPQCTEPP ATPTRFQSF SYASLNDTIR CAISVPSPTT THTYGPAYTD AVAKLSTKLT
71  TTTWGSWVPS QTVISATDTA DKYGQAAWSS QWLHASLANS TPLPSSELVL PPRDYFGPTD CYNFPEGFTF
141 GVAGSAAQIE GAIGLEGRAP SILEKLLPDT EPQDYVTNEN YYLYKQDIQR LASIGVKYYS FSISWGRILP
211 FTVPGSPINE QGLKHYNDLI DYVLEVGMVP IVTMLHFDTP LYFINASAGY VVPDIGYQNG GYWNKEFVDS
281 FVNYGKILET HFADRVPFVW TIN■PLLYAF NFTGLDNVVH AHAELYHFIH DTLNGTGKVG LKLNDNFGVP
351 KHPENQTEID AANRFNDMQL GVFAYPICLG QQYPKSILDT LPGAKPLSKK ELEYISHTTD FIGIDAYTAT
421 VISVPAEGIE YCSKQNMSTN SLYPYCVTQE TVNSYGWDIG YRSOSYVYIT PTYLRAFLSY IWNTYKTPLV
491 LS■FGFPVYA ESTRDLVDOL YDSPRSQYYL SFMSEVLKSI WEDGVDVIGA IAWSFMDNWE FGDYQQQFGM
561 QVVNRTTQER WFKKSFFDIV DFVGARNGLG SL

```

---

**Figura 4.23.** Secuencia aminoacídica deducida de BGL-1 de *T. amestolkiae*. Se indican la delección que provocaría el posible tercer intrón según la secuencia XP\_682452 (gris), los péptidos obtenidos en la huella peptídica (subrayados) y los residuos catalíticos de la enzima (verde).

#### 4.4.2.2. BGL-2

Para la amplificación de *bgl-2* se usaron tres parejas de cebadores que amplificaron fragmentos solapantes (Figura 4.24): BGL-2Fw190 y BGL-2Rv2149; BGL-2Fw5' y BGL-2Rv436; BGL-2Fw2122 y BGL-2Rv3'. El cebador BGL-2Fw795 permitió completar la secuenciación del gen. En todos los casos se obtuvieron fragmentos con alta homología (84-95%) a genes de una BGL de *T. stipitatus* ATCC 10500 (XM\_002485083) y de otra BGL de *P. marneffe* ATCC 18224 (XM\_002149010), que fueron las que se usaron de molde para el diseño de los cebadores degenerados, diferentes a las encontradas en el caso de BGL-1. El ensamblaje de todos los fragmentos obtenidos resultó en una secuencia de 2576 pb (Figura 4.24), la cual se depositó en GenBank con el número de acceso KM393203.

**BGL-2Fw5'**  
1 CAGGTTAGTGT CTTGGTC CGC AGCCTACAGT AAAGCCACAG CTGCTTTGGG CAAACTATCT CAAATGACA  
71 AGATTGGTAT GGTGACAGGC GTCGGATGGG GAAAAGGTCC ATGTGTTGGT AACACCCTG CACCTTCGGG  
141 CATCTCGTAT CCATCACTCT GTGTTCAGGA TAGTCCCCTA GGTGTTCCG **BGL-2Fw190**  
T ATGCCAACCC CGTCACAGCG  
211 T TCCCGGCGG GAACAAATGC TGGATTGACT TGGGATCGGA CCTTGATGAA CCAGAGAGGC GCTGCTATTG  
281 GAGCAGAATC CAAGGGATTA GGTGTCAATG TTCAGTTGGG CCCTGTGGCA GGACCTTTAG GCAAGATCGC  
351 GCAGGGCGGT CGTGGTTGGG AAGGTTTTGG GACAGATCCA TACCTCAGTG GTGTTGCAAT GATCGAGACT  
421 ATTACTGGTA TGCAA **BGL-2Rv436**  
AGTTC TGGTACCCAG GCATGCGCAA AGGTAAGCAC ATCGCTGCAA TCGAAAGCCT  
491 TGTATGAGAA AAGTCTAATC TTCGACAGCA CTTTATTGGT AACGAGCAAG AGTTAAACCG AGAGTCGATG  
561 AGTTCTAACA TTGACGATCG TACTTTACAT GAGCTATATC TGTGGCCCTT CGCTGATGCC GTCCGTGCCA  
631 ATGTTGCCAG TGTGATGTGC TCCTACAACC AAATCAATGG ATCATTTTCT TGTGAGAATG AAGCATCAAT  
701 GACAGGCATT TTAATAAAGG AGCTCGGCTT TCCCGGGTAT ATTATGTCTG ATTGGGATGC GCAGCACACA  
771 ACAGTCACTA GTGCTAACTC TGGG **BGL-2Fw795**  
CTCGAT ATGACCATGC CAGGC AGTGA TTATAGTGAT ACGCCGAGCA  
841 GTGTCTTTG GGGCCAAAAT CTGGCTAATG CTATCTCAAG TGGTCAAGT GCCCAGTCAC GACTGGATGA  
911 TATGGTAACT CGAATTTTGG CTGCTTGTA TTTGGTTGGC CAGGATCAAG GTTACCCTGC CGTTGCCTTT  
981 AGCTCTTGA ACGGTGGCCA AGCAAGTGT C AATGTCACAT CAAACCACAA CGTAGTTGCC CATGCAGTCG  
1051 CTCGTGATTC TATCGTTCTT CTTAAGAATA CTAACGGCAC GCTTCCGTTG AAAAAACCAT CAAGCATCGC  
1121 TATTATTGGC ACTGACGCCC AGACAAACCC TTCCGGACCA AACGCTTGTA CTGATCGTGG TTGTGATACT  
1191 GGAACCTTAG CTATGGGTTG GGGCAGCGGA ACTTGCCAAAT TCCCTTACTT GACAGATCCT CTGACAGCCA  
1261 TAAATCTCA AGCGGCCAGC GATGGCACTA CAATCACGAC TAGCATCAGT GACGATGGCA GTGCTGGGGC  
1331 GTCAGTTGCT CAAAACGCCG AGTATGCAAT CGTTTTTATC AACTCCGACT CTGGGGAAGG **GTAAGTTTAT**  
1401 ATCTTTGGCA GACTCCAATA GCTTTTAATA ATTGAATATT AGTTACATCA CCGTCGAAGG CGTCGCTGGC  
1471 GACCGCAACA ACCTCGATCC ATGGCACAGC GGTAATGCAC TGGTACAATC CGTTGCCGCA GTCAATAAAA  
1541 ATACCATTGT CGTCATCCAC AGTGTGGGC CCGTCATTCT TGAAACCATA CTGGCGCAAC CCAACGTAGT  
1611 AGCGGTGGTA TGGGCCGGCT TACCAGGACA AGAGAGTGGT TCAGCCCTTA CAGATATCCT CTATGGAAGT  
1681 ACAGCTCCCA GTGGCAAAT AACCTACAGC ATTGCTAAAC AAGCCTCCGA CTACGGCACT GCAGTAGTCA  
1751 GTGGCAACGA CAACTATCCT GAAGGGCTTT TCATTGATTA CCGACACTTC GATCAAAGTA ATATTCAACC  
1821 TCGATATGAA TTCGGCTATG GACTGTCATA TACAACCTTT GGCTACACAA ACTTGGAAT TGGTATTACG  
1891 GTTCTACTG GCCCGACTAC AGGTCAAAC GTCCCCGGTG GACCTTCTGA TCTTTTTCG TCTGTTGGAA  
1961 CTGTTACGGT GCAGGTCACA AACACAGGCA GCGTCGAGG ATCAGAAGTT GCCCAACTCT ATATTGGATT  
2031 ACCATCGTCA GCACCGTCAT GCCTGCCAAA ACAGTTGCGT GGGTTTGATA AGCTTTCCCT CGCTGCTGGA  
2101 GCTAGTGGTA CAGCAACTTT TGATTTGACA **BGL-2Fw2122**  
CGAAGAGATT TGAGTTAC TG **BGL-2Rv2149**  
GGACGTTCT CAGCAGAAAT  
2171 GG GTGGTTCC GAGCGGAGCG TTCACCATAT ATGTTGGAGC ATCTAGTAGG GATATCAGAT TACAGGGGAC  
2241 ATTTACGGTA GGTAAACAA TATGGTCAAT CATGAGACTA GATTACGGTG AGCGATGCTG ACTGTGATTA  
2311 AGCCCGGAGG TAGCTCGACC ACTTCTACTA TAAGTTCATC TAAGACATCG ACTACTACTA GCACTTCGGC  
2381 TACTACCAGC ACATCGGTTA CTACCAGCAG CAGTACTACG ATAAAGACTA CCACAAC TAG CTCGACCACA  
2451 TCATCTGCCG GGCCAACACA GACCCCGTAT GGACAGTGTG GTGGACAGGG CTGGAGCGGT CCTACAGTTT  
2521 GTTCATCCGG CTGGACTTGT AAGGTGACGA AT **BGL-2Rv3'**  
CAATGGTA CTCTCAATGC CTG TAA

**Figura 4.24.** Secuencia nucleotídica del gen *bgl-2* de *T. amestolkiae*. Se indican los cebadores usados para su amplificación y secuenciación (encuadrados), los intrones predichos (subrayados con línea continua) y el codón de parada (rojo).

Siguiendo la misma estrategia que con BGL-1, se comparó la secuencia obtenida de BGL-2 con los ARNm predichos de las BGL de los hongos con las que presentó homología. Se dedujo que BGL-2 de *T. amestolkiae* está

interrumpida por tres intrones (subrayados en la Figura 4.24). Según esta secuencia teórica (2403 pb), la proteína madura que codifica *bgl-2* tendría 800 aminoácidos (Figura 4.25), una masa molecular de 82,9 kDa y un pI de 5,1. En este caso, la masa molecular predicha es menor a la obtenida por MALDI-TOF (97,2 kDa). Al tratarse de una glicoproteína (Figura 4.12C, carril 2), se asume que el cálculo de masa molecular mediante esta técnica incluye la porción carbohidratada, por lo tanto, la diferencia entre ambos valores nos permitió estimar el porcentaje de glicosilación de BGL-2 (~15%, p/p). Esta glicosilación explicaría también la diferencia entre el pI obtenido experimentalmente (5,6) y el calculado a partir de la secuencia. La glicosilación de las BGL se discute más extensamente en el Apartado 4.4.2.

```

1  QVVSWSAAYS KATAALGKLS QNDKIGMVTG VGWKGKPCVG NTAAPSGISY PSLCVQDSPL GVRYPANPVTA
71  FPAGTNAGLT WDRITLMNQRG AAIGAESKGL GVNVLGPVA GPLGKIAQGG RGWEGFGTDP YLSGVAMJET
141 ITGMQSSGTQ ACAKHFIGNE QELNRESMSS NIDDRTLHEL YLWPFADAVR ANVASVMCSY NQINGSFSCE
211 NEASMTGILK KELGFPGYIM SDAQHTTV TSANGLDMT MPGSDYSDTP SSVLWGQNLN NAISSGOVAO
281 SRLDDMVTRI LAAWYLVGQD QGYPAVAFSS WNGGQASVNV TSNHNVVAHA VARDSIVLLK NTNGTLPKK
351 PSSIAIIGTD AQTNPSGPNA CDRGCDTGT LAMGWGSGTC QFPYLTDLPT AIKSQAASDG TTITTSISDD
421 GSAGASVAQN AEYAIVFINS DSGGYITVE GVAGDRNNLD PWHSGNALVQ SVAAVNKNTI VVIHSGPVI
491 LETILAQPNV VAVVWAGLPG QESGSALTDI LYGSTAPSGK LTYTIAKQAS DYGTAVVSGN DNYPEGLFID
561 YRHFDOSNIO PRYEFYGLS YTTFGYTNLA IGITVSTGPT TGQTVPGGPS DLFASVGTVT VQVTNTGSVA
631 GSEVAQLYIG LPSSAPSSPP KQLRGFDKLS LAAGASGTAT FDLTRRDLN WDVPPQKQWV PSGAFTIYVG
701 ASSRDIRLQG TFTPGGSTT STISSKTST TTSTSATTST SVTSSSTTI KTTTTSTTS SAGPTQTPYG
771 QGGQGWSPG TVSSGWTCK VTNQWYSQCL

```

**Figura 4.25.** Secuencia aminoacídica deducida de BGL-2 de *T. amestolkiae*. Se indican los péptidos obtenidos en la huella peptídica (subrayados), los residuos catalíticos de la enzima (verde) y las cisteínas conservadas (amarillo).

La secuencia aminoacídica de BGL-2 (Figura 4.25) presentó un 90% de identidad con las BGL teóricas de *P. marneffe* ATCC 18224 (XP\_002149046) y de *T. stipitatus* ATCC 10500 (XP\_002485128).

#### 4.4.2.3. BGL-3

Para la amplificación de *bgl-3* se usaron cuatro parejas de cebadores que amplificaron fragmentos solapantes: BGL-3 Fw70 y BGL-3Rv1044; BGL-3Fw1044 y BGL-3Rv2641; BGL-3Fw5' y BGL-3Rv498; BGL-3Fw2147 y BGL-3Rv3'. El ensamblaje de todos los fragmentos produjo una secuencia de 2735 pb (Figura 4.26), que se depositó en GenBank con el número de acceso KM393202 y presentó una homología superior al 90% con los genes de las BGL a partir de las cuales se habían diseñado los cebadores, es decir, las procedentes de *T. aculeatus* (KC112912), *T. purpurogenum*

(GQ475527), *T. funiculosus* (JX472992) y *T. stipitatus* ATCC 10500 (XM\_002480435).

Comparando la región codificante predicha para el gen *bgl-3* de *T. amestolkiae* con los ARNm de las BGL mencionadas anteriormente, se deduce que la proteína BGL-3 estaría interrumpida por tres intrones (subrayados en la Figura 4.26), con una longitud total de 2514 pb. La proteína madura, de 837 aminoácidos (Figura 4.27), tendría una masa molecular estimada de 89,7 kDa y un pI de 4,8. Como en el caso de BGL-2, estos valores son inferiores a los obtenidos experimentalmente para BGL-3 (107,0 kDa, calculado por MALDI-TOF, y pI 7,2), debido probablemente a la masa y carga aportadas por los azúcares que forman parte de la proteína al estar glicosilada (Figura 4.12C, carril 3). Teniendo en cuenta la diferencia entre la masa molecular real de la proteína y su estimación teórica, el porcentaje de glicosilación en BGL-3 sería alrededor del 16% (p/p).

La secuencia de BGL-3 (Figura 4.27) presentó un 95% de identidad de secuencia con las BGL predichas de *T. purpurogenum* (ACV87737) y de *T. aculeatus* (AGA96121), un 94% con una BGL de *T. funiculosus* (AFU91382) y un 89% con una BGL de *T. stipitatus* ATCC 10500 (XP\_002480480).

#### 4.4.3. Clasificación y filogenia

Las BGL son un grupo de enzimas hidrolíticas muy diverso. El método más aceptado para su clasificación es el propuesto por Henrissat (1991), basado en la identidad de su secuencia de aminoácidos (Apartado 1.2). La mayoría de las BGL fúngicas se encuentran distribuidas en las familias GH1 y GH3 (Henrissat, 1998).

Los motivos conservados propios de la familia GH1 son N(E/D)P y E(N/F)G (Bhatia *et al.*, 2002), con los residuos de glutamato y/o aspartato actuando como residuos catalíticos (Eyzaguirre *et al.*, 2005). El análisis de la secuencia aminoacídica de BGL-1 y el de sus proteínas homólogas en *T. stipitatus* y *P. marneffei* permitió hallar estos motivos en la proteína de *T. amestolkiae* (Figura 4.28). En este caso fueron NEP (residuos 303-305) y EFG (residuos 493-495), donde los glutamatos E304 y E493 son los residuos catalíticos.

**BGL-3Fw3'**  
1 TACTCTCCTC CCGCCTACCC TGCTCCCTGG GCCAGTGGCG CCGGGGAATG GGCTCAAGCT CATGACAGA **BGL-3Fw70**  
71 CTGTCGAGTT CGTCTCGCAA TTGACCTTGG CCGAGAAGAT AAACCTGACG ACTGGTGTG GGTACGTTGT  
141 GATACCGTTG AGCAAAATAA AGACATGGGA CTGACAATTG GTAGATGGGA GGGTGGACAA TGTGTCGGTA  
211 ACACCTGGAAG CATTCCCCGC CTGGGATTCC GCAGCCTCTG TATGCAGGAT TCACCCTCG GCGTGAGAGA  
281 CAGTATGTCG TGCCCTGTAG TCTCTTGCCCT CTTACTTCTT ACCGTCCAAA TACAAAAAGA GAAAAAAAAA  
351 AAGGTTGAAT TATATAGCTA ACAGTTTTAT GTTTCTAGCT GACTACAATA CTGCCTTCCC TGCTGGCGTC  
421 AATGTCGCCG CTACCTGGGA TCTCGATCTT GCATACCGGC GCGGTGTAGC CATGGCTGAG GAACACCGTG  
491 GCAAAGGT **BGL-3Rv498** GT GGATGTTTCTG CTTGGACCCG TTGCTGGTCC GCTAGGAAGA GCACCAGAGG GTGGCCGTAA  
561 TTGGGAAGGC TTTGCACCCG ACCCCGTTTT GACTGGTCAG ATGATGGCAA GCACTATTGA AGGAATGCAG  
631 GATACCGGTG TGATTGCTTG TGCAAAGCAC TATATCGGTA ATGAGCAAGA GCACTTTCGT CAGGGCTCCC  
701 AGGAAAATTA TACAGTCGCT GATGCTATCA GCTCGAATC CGACGATGTT ACTTTCACAG AGTTGTACCT  
771 GTGGCCGTTT GCCGATGCGG TTAGGGCAGG TGTTGGTTCC GTCATGTGTT CTTACAATCA ATTGAACAAC  
841 AGTTATTCTT GCGGCAACAG CTACAGTTTG AACCACATTC TTAAGGGAGA ACTCGACTTT CAAGGATTCTG  
911 TCATGACCGA CTGGGGTGCT CAGCATCTG GTGTGGCGA TGCTTTGGCC GGTGCGGATA TGGATATGCC  
981 TGGTGATGTG GCTTTCGACA GTGGAACCTGC TTTCTGGGGT ACTAATTGA CAATTGCCGT GCTCAATGGC **BGL-3Fw1044**  
**BGL-3Rv1044**  
1051 ACTGTTCCCG AATGGCGTAT TGATGACATG GCTGTTCTGTA TCATGTCTGC ATTCTATAAG GTTGGTCTGT  
1121 ATCGTACCCA GGTCCCATC AACTTTGCTA GCTGGACTCT GGATACCTAT GGCAATGAAT ACTACTACGC  
1191 CGGCGAGGGC TACAAGGAAA TCAACCAGCA CGTTGATGTA CGTGGTGACC ACGCCAAAGT TGTCCTGTAA  
1261 ATCGGCAGTG CCAGCATTTG TCTCCTCAAG AATGTTGACG GCGCTCTTCC GTTGACTGGC TCCGAGAGGT  
1331 TTGTCGAGT TTTTCGAGAG GATGCTGGCT CCAATCCTGA TGGTGTCAAT GGTGCTCTG ACCGTAACGT  
1401 TGATAACGGT ACCTTGGCTA TGGGATGGGG TAGTGGTACT GCCAACTTCC CTTACCTAGT TACTCCTGAA  
1471 CAAGCTATCC AAGCCGAGGT CTTGAAGAAT GGCGGAATAT TTACTGCTAT TACCGACAGC GGCGCCACCA  
1541 ATACTACAGC CACGACCGTG GCTGCTCAAG CCTCGTAAGT ACTGGTCGTA AGTAGAACAT AGCAATGGCT  
1611 CAGATTACTG ACTTTGTTTT AATTAGGGCT TGCCTAGTGT TTGCCAATGC AGACTCCGC GAGGGATACA  
1681 TCACCCTTGA CGGAAACGTG GGAGATCGTA AGAATTTGAC ATTATGGCAG AACAGTGAAG CTATGATCTC  
1751 GGCCGTTGCA GGTAACGTG ACAACACCAT AGTAGTTCTT CATACTGTTG GACCTGTTCT CGTTGAGGAC  
1821 TGGGTCAACC ATCCCAACAT CACTGCTGTT TTGTGGGCAG GTTTCCTGG AGAGCAGAGC GGAACTCTT  
1891 TGGTTGATGT TCTTTACGGC AGCGTCAACC CCGGAGGCAA GACTCCTTTC ACTTGGGGCA AGCAACGTTT  
1961 TGAATGGGA ACCGATATCA TCTACGAACC CAACAACGGA GATGGTGCTC CTCAGCAGGA CTTACCGGAG  
2031 GGTATCTTCA TTGACTACCG AACTTTGAT AAATACAATA TTACTCCAC TTACGAGTTT GGTATGGTC  
2101 TCAGTTACAG CACCTTCTCT TTCTCAAATC TCCAGGTGAC TCCTCT **BGL-3Fw2147** CGCT GCTTCGCTT ACAACCA **BGL-3Rv2147**  
2171 CACAGGTCAC AGCGGTCCCG CACCTGTCCT GGGCAAGGTT TTGAACGCCA CGGCTTATCT TTTCCCTAAC  
2241 TACATCAAAC GCATTGAAGC TTTTATTTAC CCATGGCTTA ACTCCACTGA TCTGAGGACT TCCTCTGGTG  
2311 ATCCAAATTA CGGTTGGTCT ACTTCCAAAT ACGTGCCTGA CCGTGCTCAA GACGGATCTC CGCAACCTGT  
2381 CAACCCCGCT GGTGGTGCCC CTGGTGGCAA CCCTGCGCTG TATGACCCTG TTGCCGAAAT CAGAGTGACT  
2451 GTCAAGAACA CCGGAAAGGT CGCTGGTGTT GAAGTGCTC AGCTCTATGT CTCGCTCGGT GGCCCTCCG  
2521 ATGCGCTTAA GGTTCCTCGT GGCTTTGGCC GCCTTCTCT CCGTGCTGGC GAGGAGGCTC AGTGGACTGC  
2591 CACTTTGACC CGACGTGACG TTTCTAATTG GGACACTGTC AGCCAGAAT **BGL-3Rv2641** GGGTTGTCAC AAACCTACAC  
**BGL-3Rv3'**  
2661 AAGACTGTCT ACGTCGGCAA CTCTTCTCGC AACTTGCCGC TCCAGCAGAC TTGGCTCTC CACATGCGAA  
2731 AGTAG

**Figura 4.26.** Secuencia nucleotídica del gen *bgl-3* de *T. amestolkiae*. Se indican los cebadores usados para su amplificación y secuenciación (encuadrados), los intrones predichos (subrayados con línea continua) y el codón de parada (rojo).



---

```

1  YSPPAYPAPW ASGAGEWAQA HDAVEFVSQ LTAEKINLT TGVGWEQGQC VGNTGSIPRL GFRSLCQDS
71 PLGVRDTDYN TAFPAGVNVA ATWDLDLAYR RGVAMAEHR GKGVDVQLGP VAGPLGRAPE GGRNWEGFAP
141 DPVLTGQMMMA STIEGMQDTG VIACAKHYIG NEQEHFRQGS QENYTVADAI SSNIDDVTLH ELYLWPFADA
211 VRAGVGSVMC SYNQLNNSYS CGNSYSLNHI LKGELDFQGF VMTD WGAQHS GVGDALAGAD MDMPGDVAFD
281 SGTAFWGTNL TIAVLNGTVP EWRIDDMAVR IMSAFYKVGR DRTQVPINFA SWTLDTYGNE YYYAGEGYKE
351 INQHVDVRGD HAKVVREIGS ASIVLLKNVD GALPLTGSER FVAVFGEDAG SNPDGVNGCS DRNCDNGTLA
421 MGWGSSTANF PYLVTPEQAI QAEVLKNGGI FTAITDSGAT NTTATTVAAQ ASACLVFANA DSGE GYITVD
491 GNVGDRKNLT LWQNSEAMIS AVAGNCNNTI VVLHTVGPVL VEDWVNHPNI TAVLWAGLPG EQSGNSLVDV
561 LYGSVNPGGK TPFTWGKQRS DWGTDIIYEP NNGDGAPQD FTEGIFIDYR HFDKYNITPT YEFGYGLSYS
631 TFSFSNLQVT PLAASPYKPA TGHSGPAPVL GKVLNATAYL FPNYIKRIFA FIYPWLNSTD LRTSSGDPNY
701 GWSTSKYVPD GAQDGSPQPV NPAGGAPGGN PALYDPVAEI RVTVKNTGKV AGVEVPQLYV SLGGPSDAPK
771 VLRGFGRSLG GAGEEAQWTA TLTRRDVSNW DTVSQNWVVT NYTKTVYVGN SSRNLPLQQT LALHMRK

```

---

**Figura 4.27.** Secuencia de aminoácidos deducida de BGL-3 (KM393202). Se indican los péptidos obtenidos en la huella peptídica (subrayados) y los residuos catalíticos de la enzima (verde).

---

KM393204 (BGL-1)	293	ADRVPFWVTINE	ELL	YAFNF	313	482	WNTYKTPLVLS	EF	GFVYAE	502
XP_002152823	310	ADRVPFWVTINE	ELL	YGFNF	333	499	WNTYKTPIILS	EF	GFVYAE	519
XP_002486552	329	ADRVPFWVTINE	ELL	YAFNF	349	518	WNIYETPLILS	EF	GFVYDE	538

---

**Figura 4.28.** Alineamiento de las secuencias de BGL-1 de *T. amestolkiae* y de otras BGL de la familia GH1. Se señalan los motivos conservados de dicha familia.

La familia GH3 es una de las más heterogéneas en la base de datos CAZy. Esto es debido a que los residuos que conforman los motivos conservados típicos de esta familia no son siempre los mismos, pudiendo variar entre KH(F/L/Y) y (S/T)DW (Bhatia *et al.*, 2002). De hecho, en BGL-2 los motivos conservados en su secuencia fueron KHF y SDW, mientras que en BGL-3 y el resto de las que se compararon fueron KHY y TDW (Figura 4.29).

---

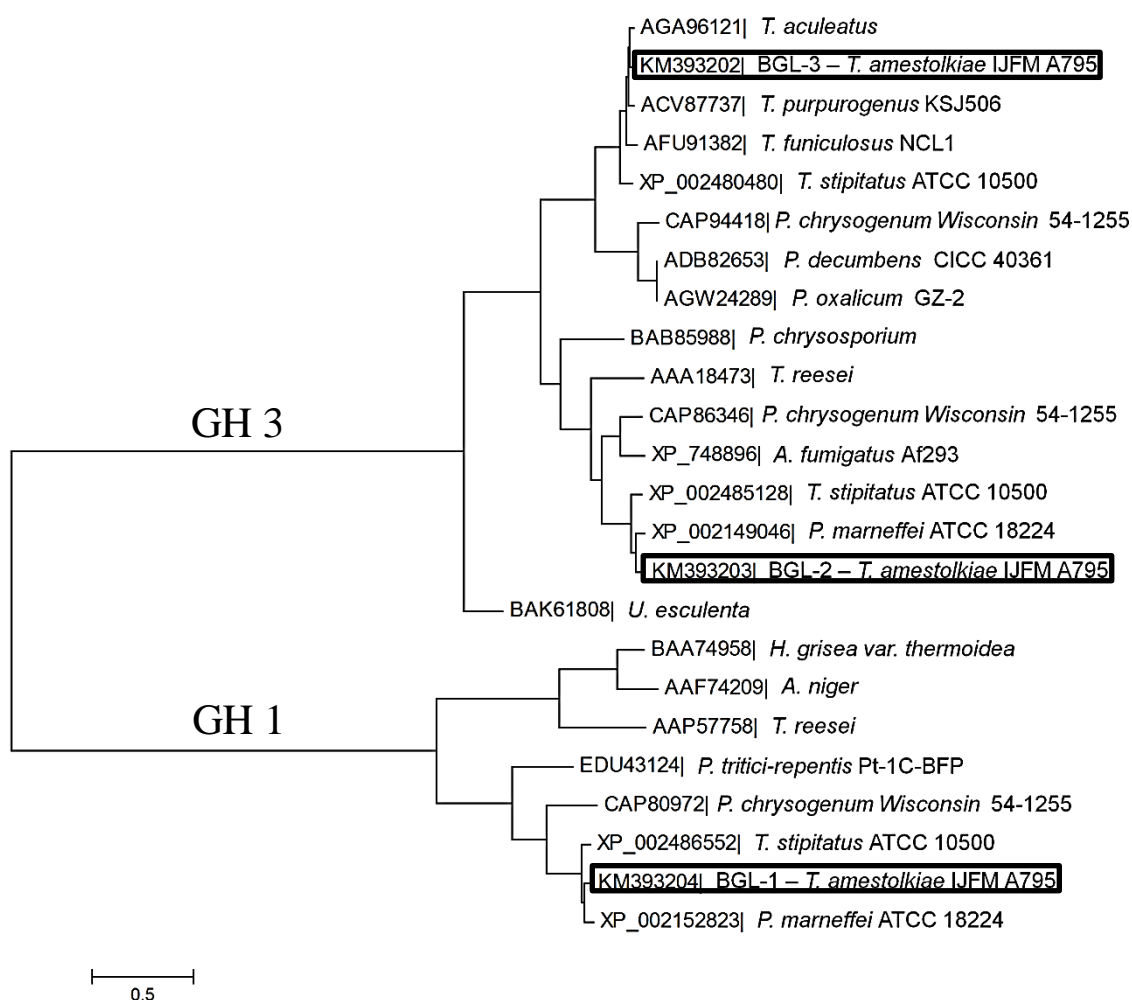
XP_002149046	158	TITGMQSSGTQACAKHY	IGN	178	238	KTELGFPGYINTD	NAQHTT	258
KM393203 (BGL-2)	140	TITGMQSSGTQACAKHF	IGN	160	220	KKELGFPGYIMSD	DAQHTT	240
XP_002485128	159	TITGMQDSGTQACAKHY	IGN	179	239	KTELGFPGYINTD	NAQHTT	259
ACV87737	171	TIQGMQDTGVIAKHY	IGN	191	261	KGELDFQGFVMTD	GAQHS	281
AGA96121	171	TIQGMQNTGVIAKHY	IGN	191	261	KGELDFQGFVMTD	SAQHS	281
KM393202 (BGL-3)	152	TIEGMQDTGVIAKHY	IGN	172	242	KGELDFQGFVMTD	GAQHS	261
AFU91382	171	TIQGMQDTGVIAKHY	IGN	191	261	KGELDFQGFVMTD	SAQHS	281

---

**Figura 4.29.** Alineamiento de las secuencias de BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae* y de otras BGL de la familia GH3. Se señalan los motivos conservados de dicha familia.



Con el fin de clasificar filogenéticamente las BGL de *T. amestolkiae*, se construyó un árbol filogenético (Figura 4.30) con las secuencias de éstas y de otras especies fúngicas representativas de las familias GH1 y GH3. Se distinguen claramente dos ramas, correspondientes a las dos familias mencionadas. En la rama de la familia GH1 encontramos BGL-1 agrupando con las BGL de *Penicillium* o *Talaromyces*. Algo más alejados se encuentran otras BGL de especies menos relacionadas de los generos *Humicola*, *Aspergillus* o *Trichoderma*. Por otro lado, la rama de la familia GH3 se subdivide en otras dos ramas. En una de ellas agrupa BGL-2, con sus mayores homólogas, separadas visiblemente de otras BGL de otras especies de los géneros *Aspergillus* o *Phanerochaete*. Y en la otra rama agrupa BGL-3, bien diferenciada de otras BGL de otros *Penicillium*. Este análisis confirma que BGL-1 pertenece a la familia GH1, mientras que BGL-2 y BGL-3 pertenecen a la familia GH3.



**Figura 4.30.** Árbol filogenético basado en las secuencias de BGL fúngicas de la familia GH1 y GH3, resaltando en recuadros las enzimas BGL-1, BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae*.

#### 4.4.4. Dominios conservados y modelado por homología

##### 4.4.4.1. BGL-1

Estructuralmente, las BGL de la familia GH1 presentan un solo dominio en forma de barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, donde se encuentra el centro activo (Davies y Henrissat, 1995; Jenkins *et al.*, 1995). El análisis de la secuencia aminoacídica de BGL-1 permitió localizar este dominio (residuos 133-589), en el que se hallaron los residuos que intervienen en la hidrólisis del enlace glicosídico (E304 y E493) (Figura 4.23). Hasta la fecha se han descrito muy pocas BGL fúngicas de la familia GH1, y no existen estructuras cristalizadas de proteínas de esta familia, por lo que el modelado por homología de BGL-1 no produjo resultados positivos.

##### 4.4.4.2. BGL-2 y BGL-3

En cuanto a la familia GH3, solo se encuentran cuatro estructuras cristalizadas de BGL fúngicas en las bases de datos. Recientemente se han depositado tres procedentes de *H. jecorina* (teleomorfo de *T. reesei*) (PDB: 4I8D, 3ZZ1 y 3ZYZ) (Karkehabadi *et al.*, 2014) y una de *A. aculeatus* (PDB: 4IIB) (Suzuki *et al.*, 2013). Estas proteínas poseen un dominio catalítico, subdividido en tres dominios estructuralmente diferentes: un dominio N-terminal, que se pliega en forma de barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, seguido del C-terminal, que lo hace en  $\alpha/\beta$  sándwich, y por último, un dominio fibronectina tipo III (FnIII).

El análisis de las secuencias de BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae* permitió localizar estos tres dominios (Tabla 4.16). La función del dominio FnIII es aún desconocida, aunque hay autores que sugieren que puede estar involucrado en la termoestabilidad de las enzimas (Pozzo *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2013). Quizás esta sea la razón por la que las enzimas BGL-2 y BGL-3 son más termoestables que BGL-1, que no posee este dominio (Apartado 4.3.3).

Sorprendentemente, en BGL-2 se encontró además un CBD. Estos dominios están integrados dentro de los llamados módulos de unión a carbohidratos (CBM, *Carbohydrate Binding Modules*). Al igual que las GH, los CBM también se clasifican en familias basadas en las similitudes en las secuencias de aminoácidos (Cantarel *et al.*, 2009) y están recogidas en la base de datos CAZy. Todos los CBD fúngicos, entre ellos el de BGL-2, son de la familia CBM1, que contienen alrededor de 35 aminoácidos, cuya estructura se estabiliza mediante dos puentes disulfuro gracias a los cuatro residuos de cisteína conservados (Kraulis *et al.*, 1989; Mattinen *et al.*, 1997) (Figura 4.25). Se considera que la principal función de las CBM es dirigir el dominio catalítico a los sustratos, incrementando así la eficacia

catalítica de la enzima sobre la superficie del polisacárido (Carrard *et al.*, 2000).

El CBD es un dominio característico de las EG y CBH (Gilkes *et al.*, 1991) y aunque se han identificado muchas familias de CBM mediante alineamiento de secuencias, solo en pocos casos se han demostrado experimentalmente que tengan función de unión al carbohidrato (Roske *et al.*, 2004). Actualmente, se postula que los CBD de celulasas fúngicas están implicadas en la desestructuración de la celulosa (Mello y Polikarpov, 2014). Hasta el momento solo se ha purificado y caracterizado una BGL fúngica con un CBD en su estructura, en concreto de *P. chrysosporium* (Lyman *et al.*, 1995). Estos autores demostraron que la enzima tenía la capacidad de unirse a celulosa microcristalina.

La diferencia más significativa en las secuencias de BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae* se encuentra en la presencia del CBD en la primera. Esta podría ser la razón por la que BGL-2 hidrolizó de forma más eficiente los celooligosacáridos ensayados. Cabe destacar que a medida que aumenta el tamaño del sustrato, BGL-3 disminuye acusadamente su actividad, mientras que BGL-2 conserva aproximadamente el 25% de su actividad sobre celohexaosa (Apartado 3.9.8).

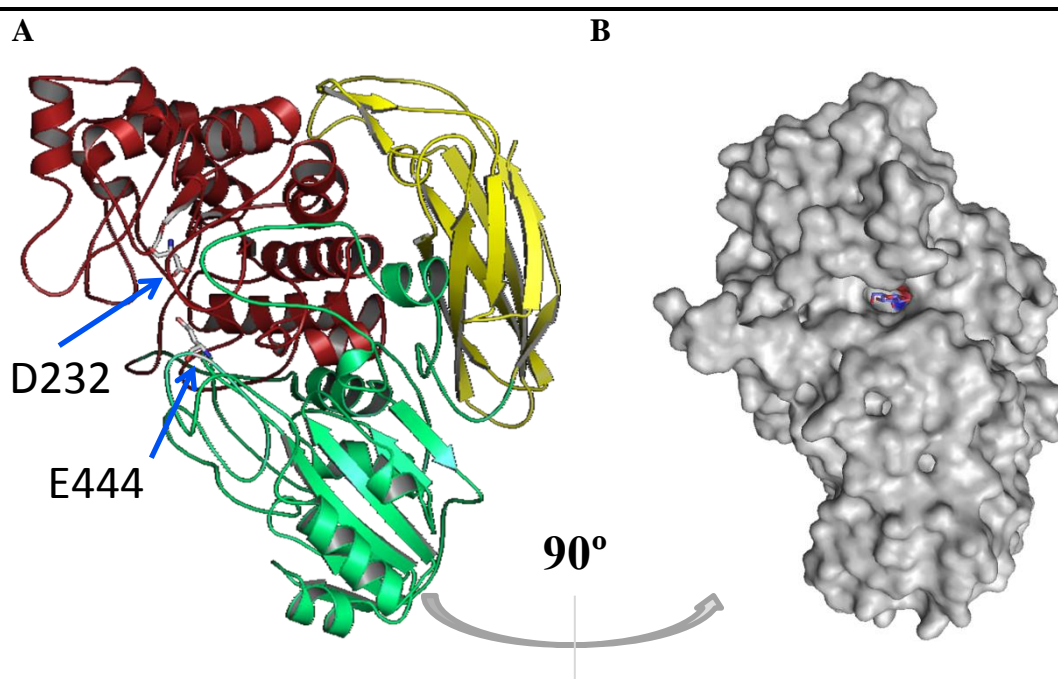
**Tabla 4.16.** Dominios conservados hallados en las secuencias de aminoácidos de BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae*.

Dominio	BGL-2	BGL-3
N-terminal	D23-A293	T32-A314
C-terminal	I336-T583	I373-Y609
FnIII	E633-S703	E754-S822
CBD	T767-P800	

En la secuencia de BGL-2 también se identificó una región rica en serinas y treoninas, entre el dominio FnIII y el CBD (S727-S761) (Figura 4.25), presentando gran cantidad de posibles sitios de O-glicosilación que pueden proteger a la enzima de la proteólisis. Esta región actuaría como un conector flexible entre el dominio catalítico y el CBD (Srisodsuk *et al.*, 1993).

El modelo de la estructura de BGL-2 de *T. amestolkiae* se obtuvo tomando como moldes las estructuras 4I8D y 3ZYZ, con las que mostró una identidad del 64,2%. El valor del índice *QMean* en ambos casos fue de -3, lo que indicaba que el modelo se ajustó bien a las estructuras experimentales del PDB. Como ocurre generalmente en las BGL, el sitio activo se encuentra entre los dominios N-terminal y C-terminal (Jeng *et al.*,

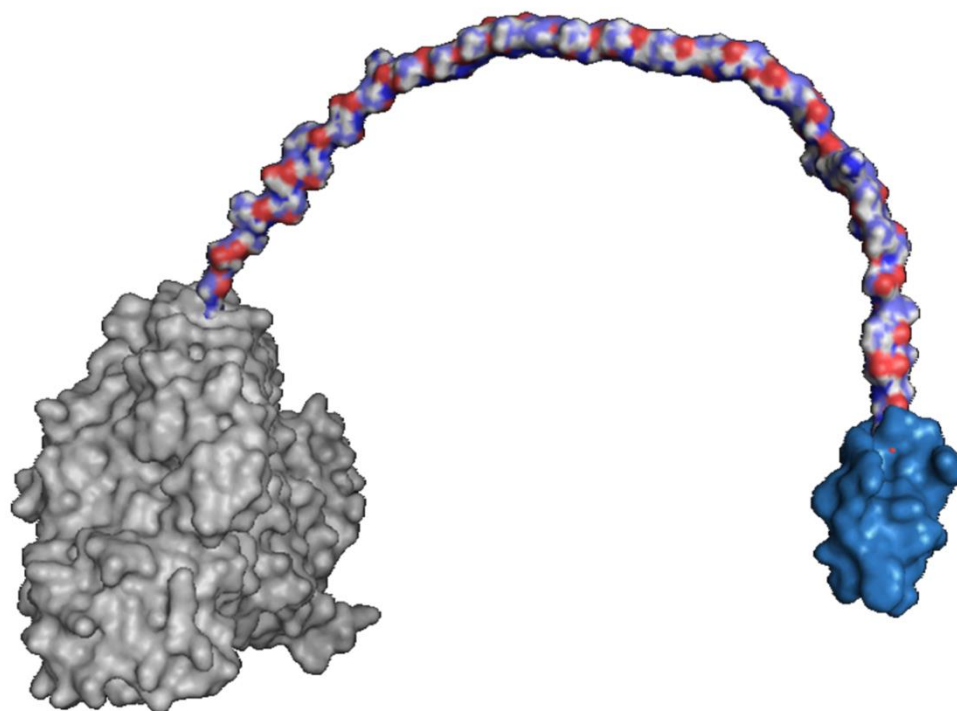
2011; Karkehabadi *et al.*, 2014; Ketudat Cairns y Esen, 2010; Suzuki *et al.*, 2013), contribuyendo cada uno de ellos con un residuo catalítico necesario para la hidrólisis del enlace glicosídico, en este caso D232 y E444. En la **Figura 4.31A** se muestra la estructura de BGL-2 con los dominios N-terminal, C-terminal y FnIII diferenciados. Al igual que en las BGL de *H. jecorina*, la topología que presenta el sitio activo de BGL-2 es de tipo bolsillo, donde se puede visualizar una glucosa colocada perfectamente, procedente de la estructura 4I8D (**Figura 4.31B**).



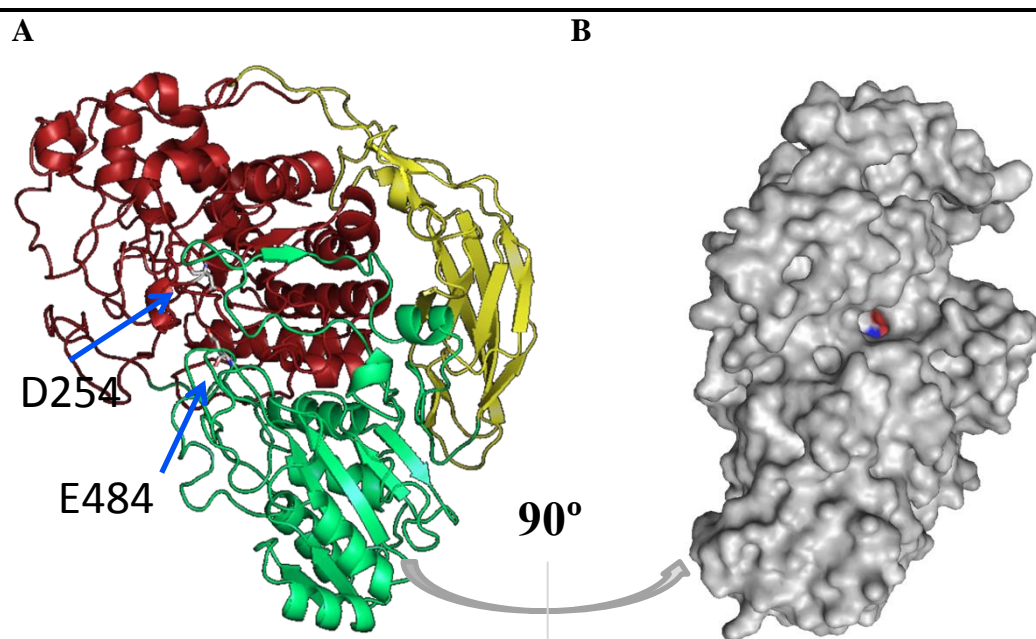
**Figura 4.31.** Modelo molecular del dominio catalítico de la enzima BGL-2 de *T. amestolkiae* en base a las estructuras 4I8D y 3ZYZ. En (A) se señalan los dominios N-terminal (rojo), C-terminal (verde) y FnIII (amarillo) y los residuos catalíticos (flechas azules); en (B) se representa la superficie del modelo molecular de la enzima, en la que se observa el sitio activo con una molécula de glucosa en su interior.

El CBD de BGL-2 se modeló aparte ya que las BGL de *H. jecorina* no poseen este dominio. El modelo que mejor ajustó ( $QMean$  -0,51) procedía de una CBH de *H. jecorina* (PDB: 1CBH). Por último, el conector que une el dominio catalítico al CBD se construyó manualmente pues no existe ninguna estructura cristalizada depositada, probablemente debido a su alta flexibilidad. En la **Figura 4.32** se muestra la estructura completa de BGL-2.

En el caso de BGL-3 se obtuvo un modelo basado en la estructura 4IIB ( $QMean$  -1,96), con la que mostró una homología del 66%. En este caso los residuos catalíticos identificados fueron D254 y E484 (**Figura 4.27**). La estructura propuesta es muy similar a la de BGL-2 sin CBD (**Figura 4.33**).



**Figura 4.32.** Superficie del modelo molecular completo de la enzima BGL-2 de *T. amestolkiae*. Se observan los tres dominios (gris, Figura 4.31B), el conector construido manualmente (azul, rojo y blanco) y el CBD en base a la estructura 1CBH (azul).



**Figura 4.33.** Modelo molecular del monómero de la enzima BGL-3 de *T. amestolkiae* en base a la estructura 4IIB. En (A) se señalan los dominios N-terminal (rojo), C-terminal (verde) y FnIII (amarillo) y los residuos catalíticos (flechas azules); en (B) se representa la superficie del modelo molecular de la enzima, en la que se observa el sitio activo.



La familia GH3 solo incluye enzimas que hidrolizan los sustratos con retención de la configuración del carbono anomérico (Withers, 2001) (Apartado 1.2.2). La distancia estimada entre los residuos catalíticos en BGL-2 y BGL-3 fue de 5,2 Å y 5,3 Å, respectivamente. Estos valores indican que estas dos enzimas probablemente actúen siguiendo este mecanismo, ya que en las GH con mecanismo de inversión la distancia entre sus residuos catalíticos es de 9-10 Å (Davies y Henrissat, 1995).

A nivel de aminoácidos, las enzimas BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae* presentan solo un 40% de homología entre ellas aunque exhiben un alto parecido estructural. Incluso con una identidad de secuencia relativamente baja con los moldes usados para modelar estas enzimas, los residuos catalíticos estaban conservados y la distancia entre ellos es similar a otras BGL estudiadas (Jeya *et al.*, 2010; Sorensen *et al.*, 2012).

A pesar de la importancia de las BGL en aplicaciones industriales, existen muy pocas estructuras cristalinas de estas enzimas depositadas en las bases de datos. Solo una BGL de cebada se ha caracterizado en detalle respecto a su estructura, mecanismo enzimático y especificidad de sustrato (Hrmova *et al.*, 2002; 2004; 2005; Varghese *et al.*, 1999). Sin embargo, el modelado de las BGL fúngicas basadas en estructuras de enzimas de plantas, bacterias o levaduras es poco fiable, debido a la baja homología y a las numerosas inserciones y deleciones. Por ello, en el presente trabajo solo se han realizado estudios teóricos. La determinación de las secuencias reales de las tres BGL de *T. amestolkiae*, actualmente en curso, y su posterior cristalización permitirá llevar a cabo estudios estructura-función y profundizar en su modo de acción.

## 4.5.APLICACIONES Y ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL CRUDO ENZIMÁTICO DE *T. amestolkiae*

### 4.5.1. Sacarificación de *slurry* ácido de paja de trigo

La conversión enzimática de celulosa en glucosa es un paso crucial en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. En este contexto, tanto la búsqueda de nuevas celulasas como la investigación en la mejora de las propiedades de los cócteles enzimáticos existentes son temas que han generado gran interés en los últimos años. Existen en el mercado varios cócteles enzimáticos disponibles para la hidrólisis de la biomasa (Tabla 1.3). La mayoría de ellos proceden de hongos del género *Trichoderma*, que tienen una alta actividad EG y CBH, sin embargo, los niveles de BGL presentes son insuficientes para una sacarificación eficiente (Berlin *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008). En este sentido, es una práctica habitual suplementar estos cócteles con otros procedentes de hongos que producen mayores niveles de BGL.

Con objeto de comparar la eficacia del crudo enzimático producido por *T. amestolkiae* (Talarozyme) con otros cócteles comerciales, se analizó la sacarificación de *slurry* ácido de paja de trigo. Éste se produjo por *steam explosion* en experimentos piloto para la producción industrial de etanol lignocelulósico (Abengoa Bioenergía). Talarozyme se obtuvo del cultivo de *T. amestolkiae* en fermentador, a los 4 días de incubación del hongo en medio Mandels con Avicel (Apartado 4.2.3) y concentrado aproximadamente 50 veces por ultrafiltración. En la Tabla 4.17 se muestran las diferentes actividades celulasas de cada complejo enzimático utilizado en los experimentos.

**Tabla 4.17.** Proteínas y actividades Avi, EG y BGL de los cócteles enzimáticos usados en las reacciones de hidrólisis de *slurry* de paja de trigo.

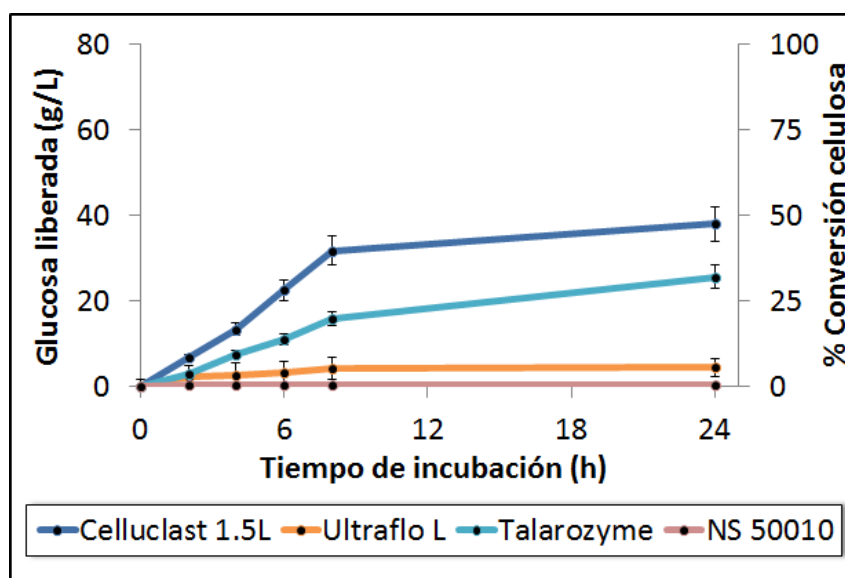
Complejo enzimático	Microorganismo fuente	Proteína (mg/mL)	Avi (U/mL)	EG (U/mL)	BGL (U/mL)
Celluclast 1.5L	<i>T. reesei</i>	78,4	357,6	915,0	10,9
Ultraflo L	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	6,7	89,4	157,9	7,6
NS 50010	<i>A. niger</i>	53,9	16,8	25,6	198,5
Talarozyme	<i>T. amestolkiae</i> IJFM A795	37,5	19,7	24,1	93,2

Para llevar a cabo la comparación de estos cócteles enzimáticos se realizaron dos tipos de experimentos con *slurry* ácido a una concentración de 20% (p/v), la concentración de sustrato utilizada normalmente en la producción industrial de etanol 2G por Abengoa Bioenergía. Teniendo en cuenta que la paja de trigo está compuesta de aproximadamente por 40% (p/p) de celulosa (Tabla 1.1), el valor máximo teórico de glucosa a liberar sería de 80 g/L.

En el primer experimento se analizó la sacarificación producida al utilizar cada crudo enzimático por separado, fijando la concentración de BGL en 0,5 U/mL. En la [Tabla 4.18](#) se muestra la composición de cada reacción de hidrólisis y en la [Figura 4.34](#) se muestra la liberación de glucosa producida por cada uno de los cócteles. NS50010 prácticamente no tuvo ningún efecto sobre el *slurry*, mientras que Celluclast 1.5L fue el que lo hidrolizó mejor, liberando hasta 40 g/L de glucosa después de 24 h, es decir, se obtuvo un 50% de la sacarificación total teórica. Esto podría explicarse porque en Celluclast 1.5L las actividades mayoritarias son EG y Avi, lo que facilitaría la hidrólisis del sustrato, al menos en las primeras etapas. Con Talarozyme y Ultraflo L se liberaron 30 g/L y 5 g/L de glucosa, respectivamente. Teniendo en cuenta que las actividades EG y Avi son mayores en Ultraflo L que en Talarozyme, este resultado sugiere que las enzimas de Talarozyme son más eficientes, o bien que *T. amestolkiae* debe secretar, además de celulasas, otras enzimas accesorias que podrían provocar un efecto sinérgico, incrementando la acción de las celulasas y mejorando la hidrólisis enzimática.

**Tabla 4.18.** Actividades Avi, EG y BGL en los crudos enzimáticos usados para la hidrólisis de 0,3 g de *slurry* de paja de trigo en un volumen final de reacción de 1,5 mL.

Complejo enzimático	Avi (U/mL)	EG (U/mL)	BGL (U/mL)
Celluclast 1.5L	16,40	41,97	0,50
Ultraflo L	5,88	10,39	0,50
NS 50010	0,04	0,06	0,50
Talarozyme	0,11	0,13	0,50



**Figura 4.34.** Glucosa liberada durante la hidrólisis de *slurry* ácido de paja de trigo usando diferentes crudos enzimáticos.



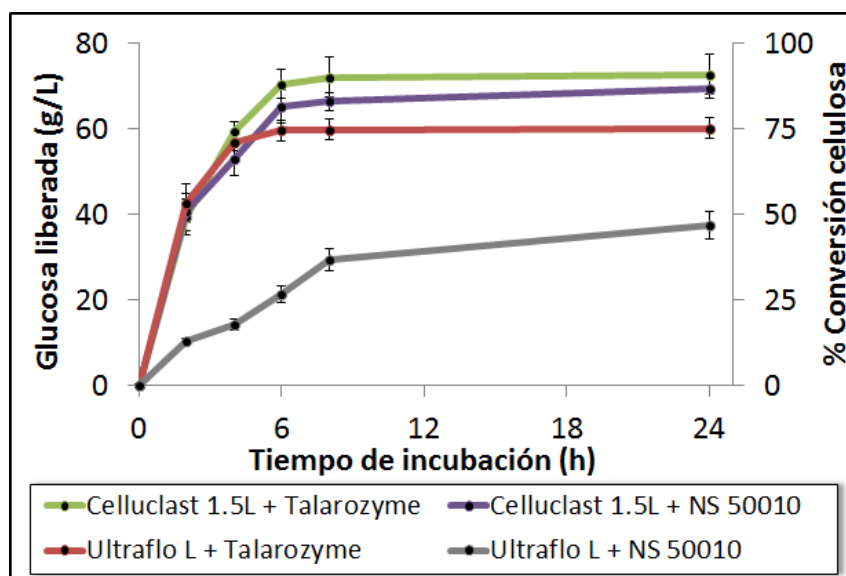
En el segundo experimento se valoró el aumento de la sacarificación del *slurry* al suplementar Celluclast 1.5L y Ultraflo L con Talarozyme o NS 50010 (Novozyme), dos crudos con alta actividad BGL, añadiendo siempre la misma cantidad de BGL (0,5 U/mL) (Tabla 4.19).

En la Figura 4.35 se muestra la liberación de glucosa en cada uno de los ensayos de suplementación. Cuando se suplementó Celluclast 1.5L con Talarozyme o con NS 50010, la hidrólisis del *slurry* fue más eficiente, liberando después de 24 h casi el doble de glucosa que sin suplemento, es decir, en torno al 90% de conversión de celulosa, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambos suplementos. Este resultado sugiere que, dado que la cantidad de EG y Avi no aumenta mucho al suplementar Celluclast 1.5L con Talarozyme y NS 50010, la actividad BGL añadida es esencial para potenciar la hidrólisis de la celulosa a glucosa.

La suplementación de Ultraflo L, con Talarozyme o con NS 50010, produjo también un aumento en la sacarificación (Figura 4.35). Sin embargo, en este caso sí hubo una gran diferencia entre los crudos usados como suplementos. Cuando se utilizó NS 50010, tras 24 h de reacción, se liberaron aproximadamente 40 g/L de glucosa, mientras que con Talarozyme se liberaron 60 g/L de glucosa, obteniendo alrededor de un 30% más de sacarificación. Estos resultados corroboraron lo expuesto en el primer experimento, sugiriendo la participación de enzimas no celulolíticas que potencian la acción de las BGL para completar el proceso de hidrólisis de la celulosa a glucosa.

**Tabla 4.19.** Actividades Avi, EG y BGL en la suplementación de los crudos enzimáticos usados para la hidrólisis de 0,3 g de *slurry* de paja de trigo en un volumen final de reacción de 1,5 mL.

	Avi (U/mL)	EG (U/mL)	BGL (U/mL)
Celluclast 1.5L + Talarozyme	16,40	41,97	0,50
Celluclast 1.5L + NS50010	0,11	0,13	0,50
Celluclast 1.5L + Talarozyme	16,40	41,97	0,50
Celluclast 1.5L + NS50010	0,04	0,06	0,50
Ultraflo L + Talarozyme	5,88	10,39	0,50
Ultraflo L + Talarozyme	0,11	0,13	0,50
Ultraflo L + NS50010	5,88	10,39	0,50
Ultraflo L + NS50010	0,04	0,06	0,50



**Figura 4.35.** Glucosa liberada durante la hidrólisis de *slurry* ácido de paja de trigo usando diferentes crudos enzimáticos suplementados con otros.

Las celulasas de las especies de *Penicillium* (o *Talaromyces*) se han aplicado de forma satisfactoria en la sacarificación de diferentes materiales celulósicos, actuando de forma más eficiente que preparaciones enzimáticas de *Trichoderma*, ya que presentan mayores niveles de BGL (Gusakov, 2011). Así, Van Wyk (1998) observó un pronunciado efecto sinérgico entre las enzimas de las preparaciones de *T. viride* y *P. funiculosum* en la hidrólisis de celulosa microcristalina, papel de filtro, papel de folio y papel de periódico. Rosgaard y cols. (2006) describieron el uso de los crudos enzimáticos de seis hongos diferentes, para potenciar la degradación enzimática de paja de cebada utilizando Celluclast 1.5L, como cóctel celulolítico base, a diferentes temperaturas (35-60 °C). Uno de los mayores efectos impulsores se observó cuando se utilizaron las enzimas de *P. funiculosum* a 50 °C, convirtiendo totalmente la celulosa en unidades de glucosa. El mismo resultado se obtuvo cuando se estudió la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar pretratado usando la preparación comercial Multifect CX 10 L con enzimas producidas por *P. funiculosum* y *Trichoderma harzianum* (Maeda et al., 2011).

En este trabajo se ha podido demostrar que Talarozyme, crudo obtenido de los cultivos de *T. amestolkiae*, posee una serie de enzimas hidrolíticas que lo hace eficaz de forma individual, o como suplemento de preparaciones enzimáticas procedentes de hongos del género *Trichoderma*, para potenciar la sacarificación de biomasa lignocelulósica.

#### 4.5.2. Análisis proteómico del secretoma de *T. amestolkiae*

El estudio del potencial de Talarozyme en experimentos de sacarificación sugirió la posible existencia de enzimas complementarias a las celulasas que podrían aumentar el rendimiento del proceso. Tradicionalmente, los hongos filamentosos han sido una gran fuente de enzimas hidrolíticas, presentando una gran cantidad de aplicaciones industriales (Bhadauria *et al.*, 2007; Dashtban *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007; Kubicek *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2005; Merino y Cherry, 2007; Sanchez, 2009; Turner *et al.*, 2007a). Una forma eficiente de evaluar su potencial biotecnológico es analizar su secretoma. Recientemente se han descrito los secretomas de varias especies del género *Penicillium*, tales como *P. funiculosum* (Guais *et al.*, 2008), *P. chrysogenum* (Jami *et al.*, 2010) y *P. echinulatum* (Ribeiro *et al.*, 2012) en relación con la producción de enzimas de interés para la degradación de la biomasa lignocelulósica. En este contexto, se llevó a cabo un análisis del secretoma de *T. amestolkiae* por dos métodos diferentes.

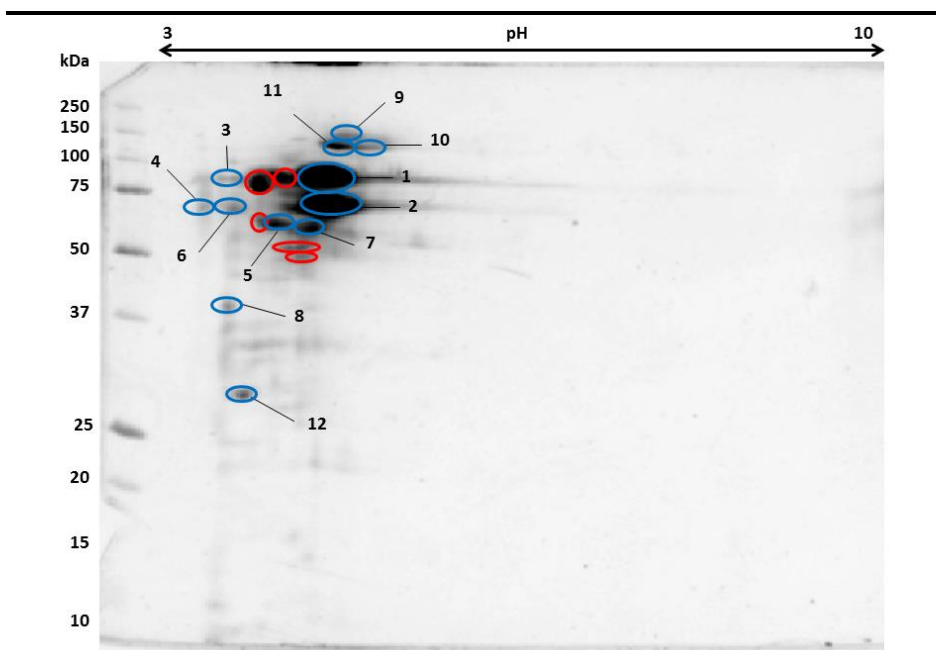
##### 4.5.2.1. Gel bidimensional

Mediante electroforesis bidimensional (2D) se obtuvo el mapa del secretoma del hongo *T. amestolkiae* creciendo sobre Avicel, como única fuente de carbono (Apartado 4.2.2). El cóctel enzimático obtenido se utilizó para realizar los experimentos de sacarificación de *slurry* ácido (Apartado 4.6.1). La mayoría de las proteínas secretadas por el hongo bajo estas condiciones tienen carácter ácido, localizándose en un rango de pH entre 3,5-5, y presentaron masas moleculares comprendidas entre 50-150 kDa (Figura 4.36). Este perfil es muy similar al obtenido en otros hongos ascomicetos creciendo sobre sustratos lignocelulósicos (Guais *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2005; Oda *et al.*, 2006).

De las 17 proteínas aisladas en el gel 2D, se pudieron identificar 12, encontrando 5 celulasas (Tabla 4.20). La no identificación de las proteínas restantes pudo deberse a que poseen pocos sitios de corte para tripsina o a que se encuentran en baja proporción en el crudo, lo que dificultaría su identificación por huella peptídica en las condiciones experimentales ensayadas.

Las proteínas más abundantes identificadas en este análisis fueron CBH. Inicialmente, el punto 1 se identificó como una xilanasa de la familia GH7, sin embargo, esta familia está compuesta principalmente por EG y CBH (Alcocer *et al.*, 2003; Furniss *et al.*, 2005), por lo que recientemente la enzima se ha redefinido como una CBH por su alta homología con las de *Talaromyces emersonii* y *T. reesei* (Texier *et al.*, 2012). El punto 2 también se identificó como una CBH, perteneciente a la familia GH6. Se observó

que ambos puntos tenían una forma alargada, mostrando una masa molecular uniforme pero un pI variable (Figura 4.36). Cuando se analizó la huella peptídica en distintas zonas del punto, se comprobó que se trataba de una única proteína, lo que sugirió que las variaciones en el pI pudieron deberse a la presencia de isoformas, probablemente resultado de modificaciones postraduccionales, siendo la glicosilación una de las más comunes (Liu *et al.*, 2013).



**Figura 4.36.** Gel de electroforesis 2D del secretoma de *Talaromyces amestolkiae* creciendo en medio Mandels con Avicel durante 7 días en matraces de 250 mL con 50 mL de medio. Se señalan los puntos identificados (azul) y los no identificados (rojo).

También se identificaron otras celulasas aunque mucho menos abundantes, como una EG de la familia GH74 (punto 9) y dos BGL de la familia GH3. Comparando los péptidos encontrados en estas dos BGL con los hallados en el análisis de la huella peptídica (Apartado 4.5.1), se dedujo que los puntos 10 y 11 correspondían a las enzimas BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae*, respectivamente (Tabla 4.21). Las otras proteínas identificadas no pertenecen a las GH. Estas son transferasas (puntos 4 y 5), peptidasas (puntos 6 y 8), una glutaminasa (punto 3) y dos proteínas de función desconocida (puntos 7 y 12).

**Tabla 4.20.** Proteínas identificadas por huella peptídica en el gel 2D del secretoma de *T. amestolkiae* crecido durante 7 días en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Mandels con Avicel.

Punto	Nº Acceso	Descripción	Especie	Score	Péptidos
1	CAC85737	CBH / GH7	<i>T. funiculosus</i>	192	4
2	XP_748511	CBH / GH6	<i>A. fumigatus</i> Af293	90	1
3	XP_002488333	Glutaminasa	<i>T. stipitatus</i> ATCC 10500	84	3
4	EGX88282	N-acetiltransferasa	<i>Cordyceps</i> <i>militaris</i> CM01	81	4
5	XP_002341294	Transportador de fosfatidilinositol	<i>T. stipitatus</i> ATCC 10500	102	6
6	XP_002486647	Serín carboxipeptidasa	<i>T. stipitatus</i> ATCC 10500	150	3
7	EIW52642	Función desconocida	<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1	98	6
8	XP_002481701	Aspártico endopeptidasa	<i>T. stipitatus</i> ATCC 10500	179	3
9	AAK77227	EG / GH74	<i>A. niger</i>	102	1
10	XP_002149046	BGL / GH3	<i>P. marneffeii</i> ATCC 18224	152	4
11	ACV87737	BGL / GH3	<i>T. purpurogenus</i>	176	10
12	XP_002152550	Función desconocida	<i>P. marneffeii</i> ATCC 18224	91	1

**Tabla 4.21.** Péptidos obtenidos en la identificación de los puntos 10 y 11 del gel 2D y su correspondencia con las enzimas BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae*.

Punto	Péptidos	Proteína
10	HFDQSNIQPR LSLAAGASGTATFDLTR WVPSGAFTIYVGASSR TLHELYLWPFADAVR	BGL-2
11	VLRGFGR TPFTWGK IMSAFYK TVYVGNSRR EINQHVDVR EIGSASIVLLK VTPLAASPYKPA SLCMQDSPLGVR HYIGNEQEHR GKGVDVQLGPVAGPLGR	BGL-3

Aunque se identificaron algunas celulasas entre las proteínas más abundantes mediante el análisis del secretoma de *T. amestolkiae* por geles,

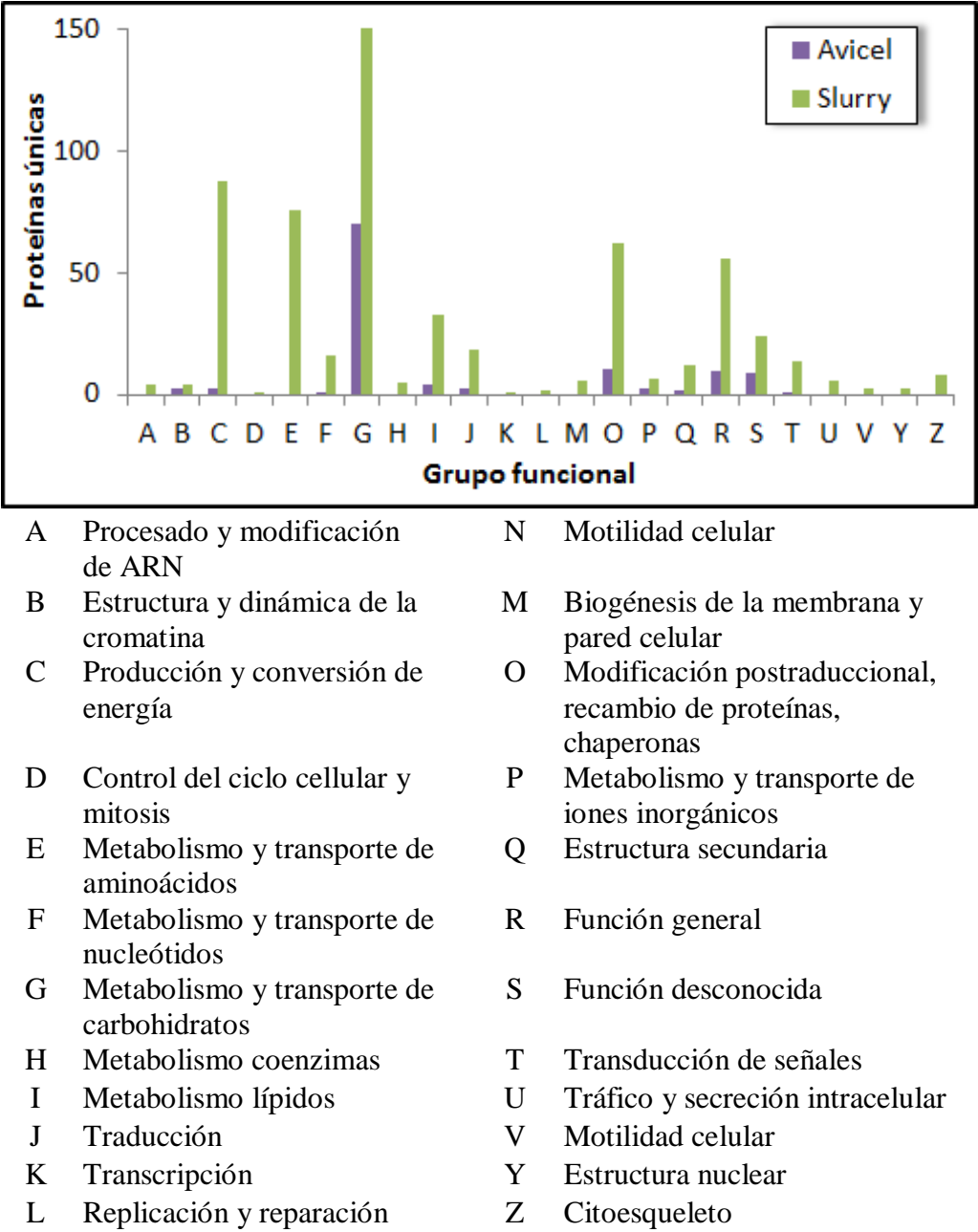
no fue posible identificar todas las BGL caracterizadas en este trabajo, pues BGL-1 no se detectó. Por ello, se abordó el estudio del conjunto de proteínas extracelulares del hongo mediante un análisis masivo de péptidos tripticos.

#### 4.5.2.2. Análisis masivo de péptidos

El análisis masivo de péptidos, mediante nanoLC-MS/MS, es una de las técnicas de proteómica más avanzadas que existen, por lo que puede proporcionar una información más completa que la electroforesis 2D. Con el fin de estudiar más a fondo las enzimas implicadas en la degradación de la biomasa lignocelulósica secretadas por *T. amestolkiae*, se hizo un análisis diferencial de los secretomas del hongo creciendo sobre celulosa microcristalina y sobre *slurry* ácido de paja de trigo, en las condiciones ensayadas en este trabajo (Apartado 4.2.2).

La estrategia seguida permitió identificar más de 300 proteínas a través de búsquedas en la base de datos NCBI nr y más de 700 usando UniProt y JGI en ambos secretomas después de 7 días de cultivo (máximo de actividad celulasa usando Avicel como fuente de carbono en medio Mandels). Se observaron diferencias significativas en la composición de los secretomas, ya que el hongo secretó casi cinco veces más proteínas en el medio con *slurry* que con Avicel (619 frente a 130, según la anotación en base a UniProt; 615 frente a 122, según JGI). Ambas bases de datos arrojaron resultados similares, y superiores en cantidad a NCBI nr, por lo que para continuar el estudio se descartó esta última. La diferencia en el número de proteínas identificadas en presencia de *slurry* podría explicarse por el gran número de proteínas que debe secretar el hongo para utilizarlo como fuente de carbono ya que es un sustrato complejo, con celulosa, hemicelulosa y lignina, además de otros componentes minoritarios propios de las paredes celulares vegetales.

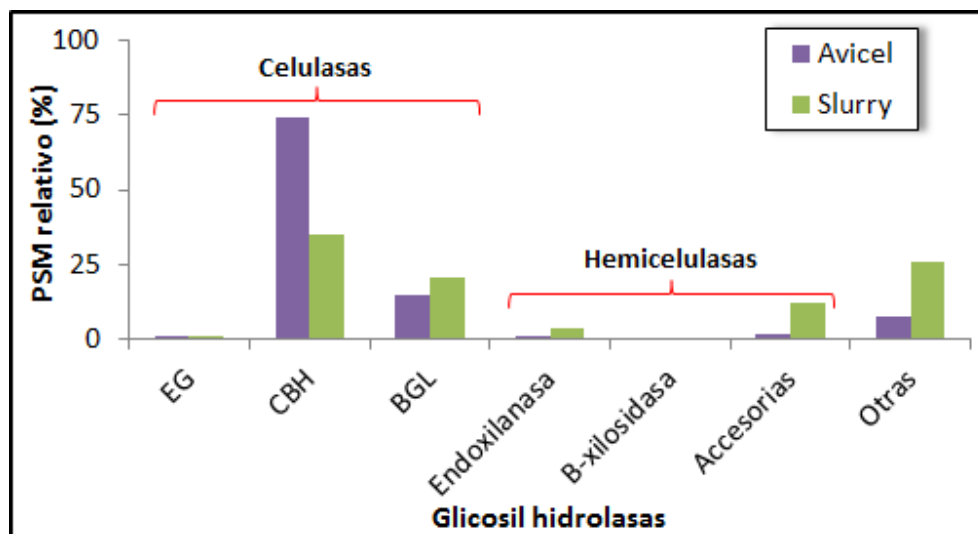
En un primer análisis, las proteínas identificadas se clasificaron de acuerdo a su papel biológico a través de grupos funcionales definidos por la base de datos KOG (*euKaryotic Orthologous Groups*) (Figura 4.37). Las proteínas mayoritarias en las dos condiciones estudiadas estaban relacionadas con el metabolismo y transporte de carbohidratos. Sin embargo, existe una gran diferencia entre el perfil de grupos KOG en Avicel y *slurry*. Al ser éste un sustrato mucho más complejo, el reparto de proteínas entre los distintos grupos es más equitativo, existiendo cuatro grupos con aproximadamente 60-80 proteínas (producción y conversión energética, metabolismo y transporte de aminoácidos, modificaciones postraduccionales y proteínas con una función general).



**Figura 4.37.** Clasificación funcional en base a las categorías KOG de las proteínas encontradas en el secretoma de *T. amestolkiae*, identificadas por nanoLC-MS/MS, utilizando la base de datos JGI. El hongo se cultivó durante 7 días en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Mandels con Avicel o *slurry* ácido de paja de trigo.

Dentro del grupo de las enzimas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos se encuentran las GH. En las dos condiciones estudiadas, las GH más abundantes son las celulasas (Figura 4.38). Estos resultados están de acuerdo con los de estudios previos en otras especies de *Penicillium* (Camassola y Dillon, 2010; Guais *et al.*, 2008; Krogh *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2012), reforzando así el potencial de este grupo de hongos filamentosos para producir celulasas eficientemente.





**Figura 4.38.** Distribución de las GH identificadas por nanoLC-MS/MS en el secretoma de *T. amestolkiae*, utilizando las bases de datos JGI. El hongo se creció durante 7 días en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Mandels con Avicel o *slurry* ácido de paja de trigo.

De las distintas celulasas identificadas en el secretoma del hongo creciendo en Avicel, las CBH fueron las enzimas más abundantes (~ 75%), seguidas de las BGL (12-15%), coincidiendo estos resultados con los observados en los geles 2D. Estos datos confirmaron lo observado mediante ensayos enzimáticos, en los que se demostró que *T. amestolkiae* es un hongo que produce un crudo enzimático rico en BGL en presencia de Avicel (Apartado 4.2.2).

Sin embargo, en el secretoma del medio con *slurry*, aunque las CBH fueron también las enzimas mayoritarias, el porcentaje de éstas disminuyó a la mitad aproximadamente (35-40%), mientras que aumentó el de las BGL (~ 20%) y otras enzimas relacionadas con la degradación del xilano, principal componente de la hemicelulosa de la paja de trigo de la que procede el *slurry*. Entre estas se encuentran las endoxilanasas y  $\beta$ -xilosasas, que actúan sobre la cadena principal del polisacárido, y otras GH accesorias (galactosidasas, manosidasas, arabinosidasas y glucuronidasas), necesarias para hidrolizar las ramificaciones del mismo. Estos resultados corroboran que en presencia de sustratos complejos, los hongos son capaces de secretar la batería de enzimas necesarias para su degradación y utilizar los azúcares liberados para continuar creciendo.

Las CBH también fueron las enzimas más abundantes secretadas por *P. echinulatum* (Ribeiro *et al.*, 2012) y *T. reesei* (Herpoel-Gimbert *et al.*, 2008; Jun *et al.*, 2011; Karlsson *et al.*, 2002) cuando crecieron sobre

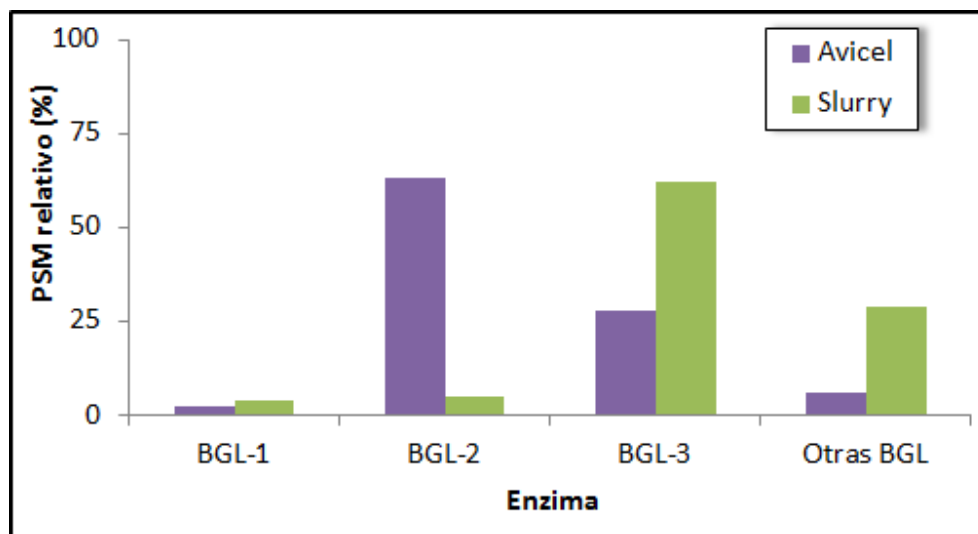


diferentes materiales lignocelulósicos. [Adav y cols. \(2012\)](#) demostraron la capacidad para secretar gran cantidad de celulasas de *T. reesei*, identificando 65 celulasas, 37 hemicelulasas y 34 proteínas degradadoras de lignina. [Guais y cols. \(2008\)](#) describieron el cóctel enzimático conocido como Rovabio® Excel, procedente de *P. funiculosum*, y demostraron que las CBH, EG y xilanasas fueron las enzimas más abundantes. Otras especies fúngicas, tales como *A. nidulans* ([Saykhedkar et al., 2012](#)) o *Fusarium verticilloides* ([Ravalason et al., 2012](#)), tienen sus secretomas más especializados en degradar hemicelulosa que celulosa.

También se detectaron endoxilanasas en el secretoma de *T. amestolkiae* creciendo en Avicel, aunque en menor proporción. A nivel transcripcional, esta actividad podría explicarse por mecanismos comunes de regulación en la expresión de celulasas y hemicelulasas ([Aro et al., 2001](#)). Las xilanasas podrían ser inducidas por celopentaosa o celobiosa como productos de una degradación lenta de la celulosa ([Royer y Nakas, 1990](#)), como se ha reportado en *T. reesei*, comprobándose que la producción de hemicelulasas puede ser inducida durante el crecimiento en presencia de celulosa ([Margolles-Clark et al., 1996](#)). Esto podría explicar la eficacia de Talarozyme, el crudo de *T. amestolkiae* producido en presencia de Avicel como única fuente de carbono, usado en la sacarificación de *slurry*, experimento en el cual se sugirió la presencia de, además de celulasas, otras enzimas que ayudan a aumentar la eficacia del proceso ([Apartado 4.6.1](#)).

Hay que tener en cuenta que las secuencias peptídicas obtenidas con esta técnica se asignaron a diferentes proteínas de diferentes especies fúngicas, pero en muchos casos, estos péptidos realmente pertenecen a una misma proteína. Tal es el caso de los péptidos asignados a las enzimas BGL encontradas en los secretomas, cuya búsqueda en las secuencias de BGL-1, BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae* ([Apartado 4.5.2](#)), nos permitió identificar a qué proteína correspondían ([Tabla 4.22](#)). Los péptidos no encontrados en las secuencias probablemente corresponden a otras BGL diferentes a las caracterizadas en este trabajo.

En la [Figura 4.39](#) se muestra la expresión diferencial de las BGL del hongo en los dos medios. BGL-3 es la que más se produjo cuando en el medio hay *slurry*, mientras que BGL-2 es la más abundante en el medio con Avicel. Por su parte, BGL-1 se expresa en niveles muy bajos en las dos condiciones, lo que explicaría que no se detectase en los geles 2D. En el medio con *slurry* son más abundantes las otras BGL que en el medio con Avicel.



**Figura 4.39.** Distribución de las BGL identificadas por nanoLC-MS/MS en el secretoma de *T. amestolkiae*, utilizando la base de datos UniProt. El hongo se creció durante 7 días en matraces de 250 mL con 50 mL de medio Mandels con Avicel o *slurry* ácido de paja de trigo.

Otras GH presentes en los secretomas de *T. amestolkiae* fueron las quitinasas (familia GH18). Sin embargo, estas enzimas no están implicadas en la degradación de la biomasa lignocelulósica, sino que están relacionadas con la lisis y reorganización de las paredes fúngicas, ya que la quitina es un homopolisacárido lineal compuesto de unidades de N-acetilglucosamina que forma parte, entre otros, de la pared celular de los hongos (Liu y Yang, 2005). Otros probables causas para justificar la presencia de quitinasas en crudos de hongos celulolíticos pueden ser el estrés sufrido por el hongo debido a la incapacidad de degradar inmediatamente la celulosa (Do Vale *et al.*, 2012) o la privación prolongada de fuente de carbono (Duo-Chuan, 2006).

El análisis de los secretomas de *T. amestolkiae* no reveló la presencia de componentes del sistema ligninolítico como peroxidasas y lacasas, sugiriendo que se diferencia de otros hongos conocidos por su capacidad para degradar celulosa y lignina, como *P. chrysosporium* (Ravalason *et al.*, 2008) o *Irpex lacteus* (Salvachúa *et al.*, 2013).

Sin embargo, se pudieron identificar swolleninas, un grupo de enzimas que no tienen actividad hidrolítica sino que rompen los puentes de hidrógeno que se encuentran entre las microfibrillas de celulosa o entre celulosa y otros polisacáridos, remodelando la pared celular y favoreciendo su posterior degradación (Whitney *et al.*, 2000). Ribeiro y cols. (2012) detectaron la presencia de swolleninas en el secretoma de *P. echinulatum*.

cuando éste se cultivó en diferentes materiales lignocelulósicos. En hongos ascomicetos como *Trichoderma* y *Aspergillus* también se han identificado este tipo de proteínas (Brotman *et al.*, 2008; Saloheimo *et al.*, 2002). Una swollenina de *A. fumigatus* purificada, y en combinación con celulasas, facilitó la sacarificación de Avicel, lo que indica que tendrían un papel importante en la mejora de procesos de bioconversión de la celulosa (Chen *et al.*, 2010).

El análisis proteómico presentado en este trabajo muestra por primera vez un perfil global del conjunto de enzimas implicadas en la degradación de biomasa lignocelulósica por *T. amestolkiae*. A pesar de que su genoma no está secuenciado, este análisis identificó satisfactoriamente un gran número de proteínas de su secretoma, demostrándose que el repertorio enzimático de este hongo no solo está formado por enzimas degradadoras de celulosa sino también por otras enzimas implicadas en la degradación de la pared celular vegetal, como hemicelulasas y swolleninas. De esta forma se explicaría el potencial de Talarozyme cuando se aplicó en la sacarificación de *slurry* ácido de paja de trigo (Apartado 4.5.1), pudiendo jugar un papel fundamental en la formulación y complementación de cócteles eficientes para la producción de bioetanol 2G.

**Tabla 4.22.** Péptidos obtenidos por nanoLC-MS/MS del secretoma de *T. amestolkiae* creciendo en Avicel y en *slurry* ácido de paja de trigo, durante 7 días en matraces de 250 mL con 50 mL de medio, asignación en base a UniProt y correspondencia con las BGL de *T. amestolkiae*.

Péptido	Proteína asignada	Correspondencia
DLVDQLYDSPR, ILPFTVPGSPINEQGIK, SQSYVYITPTYL	B6QU67, B8MP75	BGL-1
GLGVNVQLGPVAGPLGK, YANPVTAFPAGTNAGLTWDR, TLHELWLWPFADAVR, RDLSYWDVPQQK, DSIVLLK, ESMSSNIDDR, LSLAAGASGTATFDL	B8MJH5, B6QHN4	BGL-2
IDDMAVR, GKGVDVQLGPVAGPLGR, FVAVFGEDAGSNPDGVNGCSDR, AVEFVSQTLAEK, HYIGNEQEHFR, SLCMQDSPLGVR, NVDGALPLTGSR, TVYVGNSSR	C9E9M9, K4KB38, B6Q884, L0H8J8	BGL-3
YGGPLNKDEFVADYANFAR, KSALVIGELFNK, LPPLTPDEVALIK, VEDGTNGDVACDSYHR, FGVTYVDYK, GPSIWDTFSK, THEDIAILK, FLSWPR	K4K173	BGL / GH1
LFVDGELVVDNATTQR, RAAAESIVLLR, ICQTACFMTAYNK, VLYGEDVYVGYR, GVHVLLGPTINIQR, KVADHVLDER, EIYLLPFQQUALR, AAAESIVLLR, LSLTIPVR	B6QFK6, B8MDH2	BGL / GH3
TLHEIYLWPFAGVR, GVAIGEEAR	B8M0C9, B6QB23	BGL / GH3

## 5. CONCLUSIONES

---



1. La especie fúngica estudiada en este trabajo se identificó en base a su morfología y al análisis de las secuencias de marcadores genéticos, tales como las regiones ITS, RPB1 y Bt2. Se trata de una cepa de *Talaromyces amestolkiae*, siendo la primera vez que se describe como productora de celulasas.
2. El hongo secreta las mismas BGL usando Avicel o sustratos lignocelulósicos complejos como fuente de carbono. Se han caracterizado tres BGL. BGL-1 y BGL-2 son monómeros, mientras que BGL-3 es una proteína dímero funcional. BGL-2 y BGL-3 presentaron por SDS-PAGE una masa molecular similar (~100 kDa), sin embargo, la de BGL-1 fue menor (~60 kDa). El pI de las enzimas se situó entre 5,6-7,2, siendo BGL-2 la del pI más ácido, seguida de BGL-1 y BGL-3. Todas ellas son glicoproteínas, probablemente con enlaces O-glicosídicos. Los mayores valores de actividad se encontraron a pH 4 y entre 50-60 °C y son estables en un rango de pH 4-7 y a 50 °C.
3. Los estudios cinéticos revelaron que las tres BGL de *T. amestolkiae* mostraron mayor afinidad por el sustrato *p*NPG que por celobiosa. Debido a su naturaleza dimérica, la enzima BGL-3 fue la que presentó los mayores valores de eficacia catalítica sobre ambos sustratos, seguido de BGL-2 y BGL-1. Ninguna de ellas fue activa frente a la celulosa, sin embargo, todas pudieron hidrolizar celooligosacáridos de diferentes longitudes, sugiriendo que las tres enzimas son importantes en los pasos finales de la hidrólisis del polisacárido hasta glucosa.
4. Las enzimas BGL-1, BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae* mostraron actividad de transglicosilación, siendo capaces de transferir la molécula de glucosa desde el *p*NPG a los alcoholes alifáticos MeOH, EtOH, PrOH y BuOH para formar los alquilglicósidos correspondientes. Además, estas enzimas pueden unir celooligosacáridos pequeños para formar otros de mayor tamaño, siendo la celodecaosa el de mayor grado de polimerización detectado.
5. Las secuencias de los genes *bgl-1*, *bgl-2* y *bgl-3* de *T. amestolkiae* presentan una alta homología (> 80 %) con las de las BGL de especies de *Penicillium* y *Talaromyces* muy próximas filogenéticamente. La comparación de estas secuencias permitió predecir el marco de lectura de estas proteínas, cuyo análisis reveló que BGL-1 pertenece a la familia de las GH1, mientras que BGL-2 y BGL-3 son miembros de la familia de las GH3.

6. Se construyeron modelos estructurales de BGL-2 y BGL-3 de *T. amestolkiae*, en base a su identidad (~ 65%) con las BGL de *H. jecorina* y *A. aculeatus*, respectivamente, de las cuales existen estructuras cristalizadas. Las enzimas presentan los dominios descritos en otras BGL fúngicas, destacando la presencia de un dominio de unión a celulosa en BGL-2.
7. El crudo enzimático de *T. amestolkiae*, usado solo o como suplemento de otros crudos comerciales, resultó ser eficaz cuando se aplicó en la sacarificación de *slurry* ácido de paja de trigo. En este estudio, junto con el análisis del secretoma del hongo, se puso de manifiesto que las BGL de *T. amestolkiae*, así como otras proteínas presentes en el crudo, podrían ser de interés para aplicaciones biotecnológicas basadas en la degradación de la biomasa lignocelulósica.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---





- Adams, L.D. y Gallagher, S.R., 2001. Two-dimensional gel electrophoresis using the O'Farrell system. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 8:III:8.5.
- Adav, S.S., Chao, L.T. y Sze, S.K., 2012. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11:1-15.
- Adler, E., 1977. Lignin chemistry - Past, present and future. *Wood Sci. Technol.*, 11: 169-218.
- Adsul, M., Bastawde, K., Varma, A. y Gokhale, D., V, 2007. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technology*, 98: 1467-1473.
- Alcocer, M.J.C., Furniss, C.S.M., Kroon, P.A., Campbell, M. y Archer, D.B., 2003. Comparison of modular and non-modular xylanases as carrier proteins for the efficient secretion of heterologous proteins from *Penicillium funiculosum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 726-732.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402.
- Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M. y Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technol.*, 101: 4851-4861.
- Andreotti, G., Giordano, A., Trarnice, A., Mollo, E. y Trincone, A., 2006. Hydrolyses and transglycosylations performed by purified alpha-D-glucosidase of the marine mollusc *Aplysia fasciata*. *Journal of Biotechnology*, 122: 274-284.
- Aro, N., Pakula, T. y Penttilä, M., 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 719-739.
- Aro, N., Saloheimo, A., Ilmen, M. y Penttilä, M., 2001. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 24309-24314.

- Ask, M., Mapelli, V., Hock, H., Olsson, L. y Bettiga, M., 2013. Engineering glutathione biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* increases robustness to inhibitors in pretreated lignocellulosic materials. *Microbial Cell Factories*, 12: 87-97.
- Bajpai, P., 2004. Biological bleaching of chemical pulps. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 24: 1-58.
- Balat, M., Balat, H. y Oz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34: 551-573.
- Barbagallo, R.N., Spagna, G., Palmeri, R., Restuccia, C. y Giudici, P., 2004. Selection, characterization and comparison of beta-glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 58-66.
- Basso, A., Ducret, A., Gardossi, L. y Lortie, R., 2002. Synthesis of octyl glucopyranoside by almond beta-glucosidase adsorbed onto Celite R-640®. *Tetrahedron Letters*, 43: 2005-2008.
- Beguin, P. y Aubert, J.P., 1994. The Biological Degradation of Cellulose. *Fems Microbiology Reviews*, 13: 25-58.
- Belghith, H., Ellouz-Chaabouni, S. y Gargouri, A., 2001. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Po16) cellulases. *Journal of Biotechnology*, 89: 257-262.
- Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S. y Saddler, J., 2006. Inhibition of cellulase, xylanase and b-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J. Biotechnol.*, 125: 198-209.
- Berlin, A., Gilkes, N., Kilburn, D., Bura, R., Markov, A., Skomarovsky, A., Okunev, O., Gusakov, A., Maximenko, V., Gregg, D., Sinitsyn, A. y Saddler, J., 2005a. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates - evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 175-184.
- Berlin, A., Gilkes, N., Kurabi, A., Bura, R., Tu, M.B., Kilburn, D. y Saddler, J., 2005b. Weak lignin-rinding enzymes - A novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. *Applied biochemistry and biotechnology*, 121: 163-170.

- Berlin, A., Maximenko, V., Gilkes, N. y Saddler, J., 2007. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 97: 287-296.
- Bhadauria, V., Zhao, W.S., Wang, L.X., Zhang, Y., Liu, J.H., Yang, J., Kong, L.A. y Peng, Y.L., 2007. Advances in fungal proteomics. *Microbiological Research*, 162: 193-200.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18: 355-383.
- Bhat, M.K. y Bhat, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15: 583-620.
- Bhatia, Y., Mishra, S. y Bisaria, V.S., 2002. Microbial beta-glucosidases: Cloning, properties, and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22: 375-407.
- Bhatia, Y., Mishra, S. y Bisaria, V.S., 2005. Purification and characterization of recombinant *Escherichia coli*-expressed *Pichia etchellsii* beta-glucosidase II with high hydrolytic activity on sophorose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 527-535.
- Bhiri, F., Chaabouni, S.E., Limam, F., Ghrir, R. y Marzouki, N., 2008. Purification and biochemical characterization of extracellular beta-glucosidases from the hypercellulolytic pol6 mutant of *Penicillium occitanis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 149: 169-182.
- Bhiri, F., Gargouri, A., Ben Ali, M., Belghith, H., Blibech, M. y Chaabouni, S.E., 2010. Molecular cloning, gene expression analysis and structural modelling of the cellobiohydrolase I from *Penicillium occitanis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 74-81.
- Blanchette, R.A., 1991. Delignification by wood-decay fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 29: 381-398.
- Blanchette, R.A., 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.*, 73: S999-S1010.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. y Chet, I., 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology*, 147: 779-789.
- Brown, J.A., Collin, S.A. y Wood, T.M., 1987. Development of A Medium for High Cellulase, Xylanase and Beta-Glucosidase Production by A Mutant Strain (Ntg-Iii/6) of the Cellulolytic Fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 9: 355-360.
- Buchi, G., White, J.D. y Wogan, G.N., 1965. Structures of Mitorubrin and Mitrubrinol. *Journal of the American Chemical Society*, 87: 3484-3491.
- Camassola, M. y Dillon, A., 2007. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2196-2204.
- Camassola, M. y Dillon, A.J., 2010. Cellulases and Xylanases Production by *Penicillium echinulatum* Grown on Sugar Cane Bagasse in Solid-State Fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162: 1889-1900.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. y Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37: D233-D238.
- Carrard, G., Koivula, A., Soderlund, H. y Beguin, P., 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 10342-10347.
- Castellanos, O.F., Sinitsyn, A.P. y Vlasenko, E.Y., 1995. Evaluation of Hydrolysis Conditions of Cellulosic Materials by *Penicillium* Cellulase. *Bioresource Technology*, 52: 109-117.
- Chaabouni, S.E., Hadjtaieb, N., Mosrati, R. y Ellouz, R., 1994. Preliminary Assessment of *Penicillium occitanis* Cellulase - A Further Useful System. *Enzyme and Microbial Technology*, 16: 538-542.
- Chandel, A.K. y Singh, O.V., 2011. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of 'Biofuel'. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 1289-1303.

- Chandra, M., Kalra, A., Sangwan, N.S. y Sangwan, R.S., 2013. Biochemical and Proteomic Characterization of a Novel Extracellular beta-Glucosidase from *Trichoderma citrinoviride*. *Molecular Biotechnology*, 53: 289-299.
- Chang, V.S. y Holtzapple, M.T., 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied biochemistry and biotechnology*, 84: 5-37.
- Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F. y Lopes Ferreira, N., 2010. Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*, 3: 3-11.
- Chavez, R., Bull, P. y Eyzaguirre, J., 2006. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology* 123: 413-433.
- Chen, X.a., Ishida, N., Todaka, N., Nakamura, R., Maruyama, J.i., Takahashi, H. y Kitamoto, K., 2010. Promotion of Efficient Saccharification of Crystalline Cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swol. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2556-2561.
- Chitradon, L., Mahakhan, P. y Bucke, C., 2000. Oligosaccharide synthesis by reversed catalysis using alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 10: 273-280.
- Christakopoulos, P., Goodenough, P.W., Kekos, D., Macris, B.J., Claeysens, M. y Bhat, M.K., 1994. Purification and Characterization of An Extracellular Beta-Glucosidase with Transglycosylation and Exo-Glucosidase Activities from *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Biochemistry*, 224: 379-385.
- Cosgrove, D.J., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407: 321-326.
- Coutinho, M.R., Quadri, M.B., Moreira, R.F.P.M. y Quadri, M.G.N., 2004. Partial purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* (red cabbage). *Separation Science and Technology*, 39: 3769-3782.
- Cowling, E.B., 1975. Physical and Chemical Constraints in Hydrolysis of Cellulose and Lignocellulosic Materials. *Biotechnology and Bioengineering*, 163-181.
- Daniel, A.I.D., Neto, C.P., Evtuguin, D.V. y Silvestre, A.J.D., 2003. Hexenuronic acid contents of *Eucalyptus globulus* kraft pulps:

Variation with pulping conditions and effect on ECF bleachability. Tappi J., 2: 3-8.

- Das-Bradoo, S., Svensson, I., Santos, J., Plieva, F., Mattiasson, B. y Hatti-Kaul, R., 2004a. Synthesis of alkylgalactosides using whole cells of *Bacillus pseudofirmus* species as catalysts. Journal of Biotechnology, 110: 273-285.
- Dashtban, M., Schraft, H. y Qin, W., 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. International Journal of Biological Sciences, 5: 578-595.
- Davies, G. y Henrissat, B., 1995. Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases. Structure, 3: 853-859.
- de Castro, A.M. y Pereira, N., Jr., 2010. Production, Properties and Application of Cellulases in the Hydrolysis of Agroindustrial Residues. Quimica Nova, 33: U181-U208.
- de Vries, R.P. y Visser, J., 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65: 497-504.
- Delano, W.L., 2004. Use of PYMOL as a communications tool for molecular science. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 228: U313-U314.
- Dillon, A., Bettio, M., Pozzan, F., Andrichetti, T. y Camassola, M., 2011. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. Journal of Applied Microbiology, 111: 48-53.
- Do Vale, L.H., Gomez-Mendoza, D.P., Kim, M.S., Pandey, A., Ricart, C.A., Filho, E.X. y Sousa, M.V., 2012. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. Proteomics, 12: 2716-2728.
- Duo-Chuan, L., 2006. Review of fungal chitinases. Mycopathologia, 161: 345-360.
- Dutta, T., Sahoo, R., Sengupta, R., Ray, S.S., Bhattacharjee, A. y Ghosh, S., 2008. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 35: 275-282.



- Emert, G.H. y Brown, R.D., 1973. Purification and Characterization of Cellobiase from *Trichoderma viride*. Federation Proceedings, 32: 528-535.
- Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I., Hermann, A. y Hayn, M., 1991. Production of Trichoderma Cellulase in Laboratory and Pilot Scale. Bioresource Technology, 36: 51-65.
- Esteves, E.A. y Monteiro, J.B.R., 2001. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. Revista de Nutrição, 14, 43-52.
- Eyzaguirre, J., Hidalgo, M. y Leschot, A., 2005. beta-glucosidases from filamentous fungi: Properties, structure, and applications. Handbook of Carbohydrate Engineering, 645-685.
- Faber, K., 2004. Glycosyl-Transfer Reactions. Berlin, Heidelberg Springer Berlin Heidelberg. Fifth rev. and corrected edition, 307-321.
- Fadda, M.B., Curreli, N., Pompei, R., Rescigno, A., Rinaldi, A. y Sanjust, E., 1994. A Highly-Active Fungal Beta-Glucosidase - Purification and Properties. Applied biochemistry and biotechnology 44: 263-270.
- Feng, H.Y., Drone, J., Hoffmann, L., Tran, V., Tellier, C., Rabiller, C. y Dion, M., 2005. Converting a beta-glycosidase into a beta-transglycosidase by directed evolution. Journal of Biological Chemistry, 280: 37088-37097.
- Fernández-Mayoralas, A., 1997. Synthesis and modification of carbohydrates using glycosidases and lipases. Glycoscience Synthesis Of Oligosaccharides And Glycoconjugates Topics in Current Chemistry, 1-20.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C. y Thrane, U., 1990. The Significance of Yeast Extract Composition on Metabolite Production in *Penicillium*. Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, 185: 433-441.
- Flitsch, S.L., 2000. Chemical and enzymatic synthesis of glycopolymers. Current Opinion in Chemical Biology, 4: 619-625.
- Foreman, P.K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N.S., Goedegebuur, F., Houfek, T.D., England, G.J., Kelley, A.S., Meerman, H.J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H.A., Teunissen, P.J.M., Yao, J. y Ward, M., 2003. Transcriptional



regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 31988-31997.

Frisvad, J.C., 1981. Physiological Criteria and Myco-Toxin Production As Aids in Identification of Common Asymmetric *Penicillia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41: 568-579.

Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Samson, R.A. y Stolk, A.C., 1990. Chemotaxonomy of the Genus *Talaromyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 57: 179-189.

Fujii, T., Fang, X., Inoue, H., Murakami, K. y Sawayama, S., 2009. Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, 2: 24-32.

Fujii, T., Hoshino, T., Inoue, H. y Yano, S., 2014. Taxonomic revision of the cellulose-degrading fungus *Acremonium cellulolyticus* nomen nudum to *Talaromyces* based on phylogenetic analysis. *Fems Microbiology Letters*, 351: 32-41.

Fujita, Y., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Okada, H., Morikawa, Y., Kawaguchi, T., Arai, M., Fukuda, H. y Kondo, A., 2002. Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5136-5141.

Furniss, C.S.M., Williamson, G. y Kroon, P.A., 2005. The substrate specificity and susceptibility to wheat inhibitor proteins of *Penicillium funiculosum* xylanases from a commercial enzyme preparation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 574-582.

Galante, Y., De Conti, A. y Monteverdi, R., 1998. Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries. In: Harman GE, Kubicek CP, editors. *Trichoderma and Gliocladium*. London: Taylor and Francis, 327-342.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. y Bairoch, A., 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31: 3784-3788.

- Gilkes, N.R., Claeysens, M., Aebersold, R., Henrissat, B., Meinke, A., Morrison, H.D., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J. y Miller, R.C., 1991. Structural and Functional-Relationships in 2 Families of Beta-1,4-Glycanases. *European Journal of Biochemistry*, 202: 367-377.
- Glass, N.L. y Donaldson, G.C., 1995. Development of Primer Sets Designed for Use with the Pcr to Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1323-1330.
- Godfrey, T. y West, S., 1996. *Industrial Enzymology*. 2<sup>nd</sup> Edition. London, UK: MacMillan Press, 226-264.
- Goncalves, D.L., Matsushika, A., de Sales, B.B., Goshima, T., Bon, E.P. y Stambuk, B.U., 2014. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. *Enzyme and Microbial Technology*, 63: 13-20.
- Graham, H. y Balnave, D., 1995. Dietary enzymes for increasing energy availability. *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 15: 295-309.
- Guais, O., Borderies, G., Pichereaux, C., Maestracci, M., Neugnot, V., Rossignol, M. y Francois, J.M., 2008. Proteomics analysis of "Rovabio (TM) Excel", a secreted protein cocktail from the filamentous fungus *Penicillium funiculosum* grown under industrial process fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35: 1659-1668.
- Gueguen, Y., Chemardin, P., Arnaud, A. y Galzy, P., 1995. Purification and Characterization of An Intracellular Beta-Glucosidase from *Botrytis-Cinerea*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 900-906.
- Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L. y Cordonnier, R.E., 1985. The Aroma of Grapes .1. Extraction and Determination of Free and Glycosidically Bound Fractions of Some Grape Aroma Components. *Journal of Chromatography*, 331: 83-90.
- Gusakov, A.V., 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 29: 419-425.
- Gusakov, A.V., Salanovich, T.N., Antonov, A.I., Ustinov, B.B., Okunev, O.N., Burlingame, R., Emalfarb, M., Baez, M. y Sinitsyn, A.P., 2007. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic

hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 97: 1028-1038.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G. y Faaij, A.P.C., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass & Bioenergy*, 28: 384-410.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166: 557-580.

Harhangi, H.R., Steenbakkers, P.J.M., Akhmanova, A., Jetten, M.S.M., van der Drift, C. y Op den Camp, H.J.M., 2002. A highly expressed family 1 beta-glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp E2. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression*, 1574: 293-303.

He, H., Qin, Y., Chen, G., Li, N. y Liang, Z., 2013. Two-Step Purification of a Novel beta-Glucosidase with High Transglycosylation Activity and Another Hypothetical beta-Glucosidase in *Aspergillus oryzae* HML366 and Enzymatic Characterization. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169: 870-884.

Helenius, A. y Aebi, M., 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 73: 1019-1049.

Henrissat, B., 1991. A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities. *Biochemical Journal*, 280: 309-316.

Henrissat, B., 1998. Glycosidase families. *Biochemical Society Transactions*, 26: 153-156.

Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C. y Schulein, M., 1985. Synergism of Cellulases from *Trichoderma reesei* in the Degradation of Cellulose. *Bio-Technology*, 3: 722-726.

Hernandez, L.F., Espinosa, J.C., Fernandez-Gonzalez, M. y Briones, A., 2003. beta-glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 171-176.

- Herpoel-Gimbert, I., Margeot, A., Dolla, A., Jan, G., Molle, D., Lignon, S., Mathis, H., Sigoillot, J.C., Monot, F. y Asther, M., 2008. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. *Biotechnology for Biofuels*, 1: 18-30.
- Hidalgo, M., Steiner, J. y Eyzaguirre, J., 1992. Beta-Glucosidase from *Penicillium purpurogenum* - Purification and Properties. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 15: 185-191.
- Hilden, L. y Johansson, G., 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology Letters*, 26: 1683-1693.
- Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W. y Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315: 804-807.
- Hoh, Y.K., Yeoh, H.H. y Tan, T.K., 1992. Properties of Beta-Glucosidase Purified from *Aspergillus niger* Mutants Usdb-0827 and Usdb-0828. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37: 590-593.
- Houbraken, J., de Vries, R.P. y Samson, R.A., 2014. Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. *Advances in Applied Microbiology*, 86: 199-249.
- Houbraken, J. y Samson, R.A., 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in mycology*, 70: 1-51.
- Hrmova, M., De Gori, R., Smith, B.J., Fairweather, J.K., Driguez, H., Varghese, J.N. y Fincher, G.B., 2002. Structural basis for broad substrate specificity in higher plant beta-D-glucan glucohydrolases. *Plant Cell*, 14: 1033-1052.
- Hrmova, M., De Gori, R., Smith, B.J., Vasella, A., Varghese, J.N. y Fincher, G.B., 2004. Three-dimensional structure of the barley beta-D-glucan glucohydrolase in complex with a transition state mimic. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 4970-4980.
- Hrmova, M., Streltsov, V.A., Smith, B.J., Vasella, A., Varghese, J.N. y Fincher, G.B., 2005. Structural rationale for low-nanomolar binding of transition state mimics to a family GH3 beta-D-glucan glucohydrolase from barley. *Biochemistry*, 44: 16529-16539.

- Ikeda, Y., Hayashi, H., Okuda, N. y Park, E.Y., 2007. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. *Biotechnology Progress*, 23: 333-338.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H., 1990. High-Efficiency Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Gene*, 96: 23-28.
- Ito, J., Ebe, T., Shibasaki, S., Fukuda, H. y Kondo, A., 2007. Production of alkyl glucoside from cellooligosaccharides using yeast strains displaying *Aspergillus aculeatus* beta-glucosidase 1. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 49: 92-97.
- Iwashita, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimoi, H. y Ito, K., 1998. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound beta-glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62: 1938-1946.
- Jaeger, G., Girfoglio, M., Dollo, F., Rinaldi, R., Bongard, H., Commandeur, U., Fischer, R., Spiess, A.C. y Buechs, J., 2011. How recombinant swollenin from *Kluyveromyces lactis* affects cellulosic substrates and accelerates their hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 4: 33-49.
- Jagtap, S.S., Dhiman, S.S., Kim, T.S., Li, J., Kang, Y.C. y Lee, J.K., 2013. Characterization of a beta-1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Pholiota adiposa* and its application to the hydrolysis of biomass. *Biomass & Bioenergy*, 54: 181-190.
- Jami, M.S., Barreiro, C., Garcia-Estrada, C. y Martin, J.F., 2010. Proteome Analysis of the Penicillin Producer *Penicillium chrysogenum* Characterization Of Protein Changes During The Industrial Strain Improvement. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9: 1182-1198.
- Jeffries, T.W., 2008. Introduction of a special issue on biotechnology for the pulp and paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 43: 77-88.
- Jeng, W.Y., Wang, N.C., Lin, M.H., Lin, C.T., Liaw, Y.C., Chang, W.J., Liu, C.I., Liang, P.H. y Wang, A.H.J., 2011. Structural and functional analysis of three beta-glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*, 173: 46-56.
- Jenkins, J., Leggio, L.L., Harris, G. y Pickersgill, R., 1995. Beta-Glucosidase, Beta-Galactosidase, Family-A Cellulases, Family-F

Xylanases and 2 Barley Glycanases Form A Superfamily of Enzymes with 8-Fold Beta/Alpha-Architecture and with 2 Conserved Glutamates Near the Carboxy-Terminal Ends of Beta-Strand-4 and Beta-Strand-7. *Febs Letters*, 362: 281-285.

Jeya, M., Joo, A.R., Lee, K.M., Tiwari, M.K., Lee, K.M., Kim, S.H. y Lee, J.K., 2010. Characterization of beta-glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1473-1484.

Joo, A.R., Jeya, M., Lee, K.M., Lee, K.M., Moon, H.J., Kim, Y.S. y Lee, J.K., 2010. Production and characterization of beta-1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Process Biochemistry*, 45: 851-858.

Jorgensen, H., Morkeberg, A., Krogh, K.B.R. y Olsson, L., 2005. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 42-48.

Jorgensen, H. y Olsson, L., 2006. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 381-390.

Jun, H., Kieselbach, T. y Jonsson, L.J., 2011. Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. *Microbial Cell Factories*, 10: 68-78.

Jurado, M., Martínez-Alcalá, A., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2007. Screening de hongos productores de celulasas para la producción de bioetanol. Abs. XXI Congr. Nac. Microbiol., Sevilla 17-20 Septiembre.

Karboune, S., Geraert, P.A. y Kermashat, S., 2008. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 903-909.

Karkehabadi, S., Helmich, K.E., Kaper, T., Hansson, H., Mikkelsen, N.E., Gudmundsson, M., Piens, K., Fajdala, M., Banerjee, G., Scott-Craig, J.S., Walton, J.D., Phillips, G.N. y Sandgren, M., 2014. Biochemical Characterization and Crystal Structures of a Fungal Family 3 beta-



Glucosidase, Cel3A from *Hypocrea jecorina*. Journal of Biological Chemistry, 289: 31624-31637.

Karlsson, J., Siika-aho, M., Tenkanen, M. y Tjerneld, F., 2002. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. Journal of Biotechnology, 99: 63-78.

Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piaphukiew, J., Whalley, A.J., Reynolds, C.D. y Sihanonth, P., 2007. Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr.) Rehm. Fems Microbiology Letters, 270: 162-170.

Kawamori, M., Morikawa, Y., Shinsha, Y., Takayama, K. y Takasawa, S., 1985. Production of Ethanol from Biomasses .2. Preparation of Mutants Resistant to Catabolite Repression of *Trichoderma reesei*. Agricultural and Biological Chemistry, 49: 2875-2879.

Ketudat Cairns, J.R. y Esen, A., 2010. beta-glucosidases. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 67: 3389-3405.

Kim, Y., Nandakumar, M.P. y Marten, M.R., 2007. Proteomics of filamentous fungi. Trends Biotechnol., 25: 395-400.

Kim, Y.S., Park, C.S. y Oh, D.K., 2006. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable beta-galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. Enzyme and Microbial Technology, 39: 903-908.

Kirk, T.K. y Farrell, R.L., 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. Annu. Rev. Microbiol., 41: 465-505.

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P. y Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angewandte Chemie-International Edition, 44: 3358-3393.

Klinke, H.B., Thomsen, A.B. y Ahring, B.K., 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. Applied Microbiology and Biotechnology, 66: 10-26.

Koppram, R. y Olsson, L., 2014. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings. Biotechnology for Biofuels, 7: 54-63.

- Koshland, D.E., 1953. Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 28: 416-436.
- Kouptsova, O.S., Klyachko, N.L. y Levashov, A.V., 2001. Synthesis of alkyl glycosides catalyzed by beta-glycosidases in a system of reverse micelles. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 27: 380-384.
- Kraulis, J., Clore, G.M., Nilges, M., Jones, T.A., Pettersson, G., Knowles, J. y Gronenborn, A.M., 1989. Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry*, 28: 7241-7257.
- Kren, V. y Thiem, J., 1997. Glycosylation employing bio-systems: from enzymes to whole cells. *Chemical Society Reviews*, 26: 463-473.
- Krogh, K.B.R., Harris, P.V., Olsen, C.L., Johansen, K.S., Hojer-Pedersen, J., Borjesson, J. y Olsson, L., 2010. Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 beta-glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 143-154.
- Krogh, K.B.R., Morkeberg, A., Jorgensen, H., Frisvad, J.C. y Olsson, L., 2004. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 113: 389-401.
- Kubicek, C.P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M. y Seiboth, B., 2009. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels*, 2: 19-33.
- Kuhad, R.C., Gupta, R. y Singh, A., 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011: 280696-280706.
- Kumar, R., Singh, S. y Singh, O.V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 377-391.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227: 680-685.
- Laghi, L., 2013. Cellulose strand, <http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulose>.



- Langston, J., Sheehy, N. y Xu, F., 2006. Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3 beta-glucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1764: 972-978.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H. y Dale, B.E., 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 121: 1081-1099.
- Le Crom, S., Schackwitz, W., Pennacchio, L., Magnuson, J.K., Culley, D.E., Collett, J.R., Martin, J., Druzhinina, I.S., Mathis, H., Monot, F., Seiboth, B., Cherry, B., Rey, M., Berka, R., Kubicek, C.P., Baker, S.E. y Margeot, A., 2009. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 16151-16156.
- Leatham, G.F., 1986. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 51-58.
- Lee, G.W., Yoo, M.H., Shin, K.C., Kim, K.R., Kim, Y.S., Lee, K.W. y Oh, D.K., 2013. beta-Glucosidase from *Penicillium aculeatum* hydrolyzes exo-, 3-O-, and 6-O-beta-glucosides but not 20-O-beta-glucoside and other glycosides of ginsenosides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 6315-6324.
- Lee, J., Park, J.S., Moon, J.Y., Kim, K.Y. y Moon, H.M., 2003. The influence of glycosylation on secretion, stability, and immunogenicity of recombinant HBV pre-S antigen synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303: 427-432.
- Lee, K.M., Jeya, M., Joo, A.R., Singh, R., Kim, I.W. y Lee, J.K., 2010. Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 206-211.
- Leite, R.S.R., Alves-Prado, H.F., Cabral, H., Pagnocca, F.C., Gomes, E. y Da Silva, R., 2008. Production and characteristics comparison of crude beta-glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 43: 391-395.
- Leite, R.S.R., Gomes, E. y Da Silva, R., 2007. Characterization and comparison of thermostability of purified beta-glucosidases from a

mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, 42: 1101-1106.

Leschine, S.B., 1995. Cellulose Degradation in Anaerobic Environments. *Annual Review of Microbiology*, 49: 399-426.

Levy, I., Shani, Z. y Shoseyov, O., 2002. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-beta-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular Engineering*, 19: 17-30.

Li, H., Kim, N.J., Jiang, M., Kang, J.W. y Chang, H.N., 2009. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 100: 3245-3251.

Li, X.L. y Calza, R.E., 1991. Kinetic-Study of A Cellobiase Purified from *Neocallimastix frontalis* Eb188. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1080: 148-154.

Lin, Y. y Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 627-642.

Lineweaver, H. y Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56: 658-666.

Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y. y Shen, Q., 2012. Characterization of a thermostable beta-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories*, 11: 25-40.

Liu, G., Zhang, L., Wei, X., Zou, G., Qin, Y., Ma, L., Li, J., Zheng, H., Wang, S., Wang, C., Xun, L., Zhao, G.P., Zhou, Z. y Qu, Y., 2013. Genomic and Secretomic Analyses Reveal Unique Features of the Lignocellulolytic Enzyme System of *Penicillium decumbens*. *Plos One*, 8: e55185-e55197.

Liu, P.G. y Yang, Q., 2005. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. *Research in Microbiology*, 156: 416-423.

Lombard, V., Ramulu, H.G., Drula, E., Coutinho, P.M. y Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42: D490-D495.

- Lyman, E.S., Li, B. y Renganathan, V., 1995. Purification and Characterization of A Cellulose-Binding beta-glucosidase from Cellulose-Degrading Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2976-2980.
- Lynd, L.R., Cushman, J.H., Nichols, R.J. y Wyman, C.E., 1991. Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass. *Science*, 251: 1318-1323.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. y Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66: 506-516.
- Maeda, R.N., Barcelos, C.A., Melo Santa Anna, L.M. y Pereira, N., 2013. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of Biotechnology*, 163: 38-44.
- Maeda, R.N., Serpa, V.I., Lima Rocha, V.A., Alves Mesquita, R.A., Melo Santa Anna, L.M., de Castro, A.M., Driemeier, C.E., Pereira, N., Jr. y Polikarpov, I., 2011. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, 46: 1196-1201.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G. y Bhat, M.K., 2000. Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 461-468.
- Makropoulou, M., Christakopoulos, P., Tsitsimpikou, C., Kekos, D., Kolisis, F.N. y Macris, B.J., 1998. Factors affecting the specificity of beta-glucosidase from *Fusarium oxysporum* in enzymatic synthesis of alkyl-beta-D-glucosides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22: 97-101.
- Mamma, D., Kalogeris, E., Hatzinikolaou, D.G., Lekanidou, A., Kekos, D., Macris, B.J. y Christakopoulos, P., 2004. Biochemical characterization of the multi-enzyme system produced by *Penicillium decumbens* grown on rutin. *Food Biotechnology*, 18: 1-18.
- Mandels, M. y Reese, E.T., 1957. Induction of Cellulase in *Trichoderma viride* As Influenced by Carbon Sources and Metals. *Journal of Bacteriology*, 73: 269-278.

- Mandels, M. y Weber, J., 1969. Production of Cellulases. *Advances in Chemistry Series*, 95: 391-414.
- Mansfield, S.D., Wong, K.K.Y., de Jong, E. y Saddler, J.N., 1996. Xylanase prebleaching of fractions of Douglas fir kraft pulp of different fibre length. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46: 319-326.
- Margolles-Clark, E., Hayes, C.K., Harman, G.E. y Penttila, M., 1996. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2145-2151.
- Marjamaa, K., Toth, K., Bromann, P.A., Szakacs, G. y Kruus, K., 2013. Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. *Enzyme and Microbial Technology*, 52: 358-369.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martínez, M.J., Gutierrez, A. y del Rio, J.C., 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8: 195-204.
- Martínez, A.T., Rencoret, J., Nieto, L., Jimenez-Barbero, J., Gutierrez, A. y del Rio, J.C., 2011. Selective lignin and polysaccharide removal in natural fungal decay of wood as evidenced by in situ structural analyses. *Environmental Microbiology*, 13: 96-107.
- Martínez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P.M., Cullen, D., Danchin, E.G., Grigoriev, I.V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C.P., Han, C.S., Ho, I., Larrondo, L.F., de Leon, A.L., Magnuson, J.K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A.A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C.L., Yao, J., Barbote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C.R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D.S., Lucas, S.M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M. y Brettin, T.S., 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 26: 553-560.
- Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J.P. y Ramos, L.P., 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology*, 99: 1417-1424.

- Mateo, J.J. y DiStefano, R., 1997. Description of the beta-glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiology*, 14: 583-591.
- Mattinen, M.L., Linder, M., Teleman, A. y Annala, A., 1997. Interaction between celohexaose and cellulose binding domains from *Trichoderma reesei* cellulases. *Febs Letters*, 407: 291-296.
- McCarter, J.D. y Withers, S.G., 1994. Mechanisms of Enzymatic Glycoside Hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4: 885-892.
- Medina, M.L., Haynes, P.A., Breci, L. y Francisco, W.A., 2005. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics*, 5: 3153-3161.
- Medve, J., Stahlberg, J. y Tjerneld, F., 1994. Adsorption and Synergism of Cellobiohydrolase-I and Cellobiohydrolase-II of *Trichoderma reesei* During Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 1064-1073.
- Mello, B.L. y Polikarpov, I., 2014. Family 1 carbohydrate binding-modules enhance saccharification rates. *AMB Express*, 4: 36-42.
- Merino, S.T. y Cherry, J., 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 108: 95-120.
- Morozova, V.V., Gusakov, A.V., Andrianov, R.M., Pravilnikov, A.G., Osipov, D.O. y Sinitsyn, A.P., 2010. Cellulases of *Penicillium verruculosum*. *Biotechnology journal*, 5: 871-880.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. y Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.*, 96: 673-686.
- Ng, I.S., Li, C.W., Chan, S.P., Chir, J.L., Chen, P.T., Tong, C.G., Yu, S.M. y Ho, T.H.D., 2010. High-level production of a thermoacidophilic beta-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*, 101: 1310-1317.
- Nieves, R.A., Ehrman, C.I., Adney, W.S., Elander, R.T. y Himmel, M.E., 1998. Survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14: 301-304.

- Nitta, M., Furukawa, T., Shida, Y., Mori, K., Kuhara, S., Morikawa, Y. y Ogasawara, W., 2012. A new Zn(II)(2)Cys(6)-type transcription factor BglR regulates beta-glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology*, 49: 388-397.
- O'Sullivan, A.C., 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4: 173-207.
- Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O. y Iwashita, K., 2006. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3448-3457.
- Ouyang, J., Yan, M., Kong, D. y Xu, L., 2006. A complete protein pattern of cellulase and hemicellulase genes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology journal*, 1: 1266-1274.
- Palma-Fernández, E.R., Gomes, E. y da Silva, R., 2002. Purification and characterization of two beta-glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Folia Microbiologica*, 47: 685-690.
- Park, T.H., Choi, M.W., Park, C.S., Lee, S.B., Kang, H.Y., Shon, K.J., Park, J.S. y Cha, J.H., 2005. Substrate specificity and transglycosylation catalyzed by a thermostable beta-glucosidase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 411-422.
- Park, Y.K., Aguiar, C.L., Alencar, S.M. y Scamparini, A.P., 2001. Biotransformation of soya beta -glycosyl isoflavones into non-glycans isoflavones by fungal beta -glycosidase. *Biotechnol. Cienc. Desenvolv.*, 20: 12-14.
- Parry, N.J., Beever, D.E., Owen, E., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J. y Bhat, M.K., 2001. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemical Journal*, 353: 117-127.
- Pere, J., Siika-aho, M., Buchert, J. y Viikari, L., 1995. Effects of purified *Trichoderma reesei* cellulases on the fiber properties of Kraft pulp. *Tappi J.*, 78: 71-78.
- Perestelo, F., González, J.M. y Falcón, M.A., 1999. Lignin biodegradation: Importance of bacteria and imperfect fungi. *Recent Res. Devel. Biotech. & Bioeng.*, 2: 175-210.



- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. y Martínez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology. The official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 5: 53-63.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M. y Cottrell, J.S., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20: 3551-3567.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. y Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8: 785-786.
- Peterson, R. y Nevalainen, H., 2012. *Trichoderma reesei* RUT-C30-thirty years of strain improvement. *Microbiology-Sgm*, 158: 58-68.
- Pettersen, R.C., 1984. The chemical composition of wood. En "The Chemistry of Solid Wood" (Powell, R.M. ed.), ACS, 57-126.
- Pitson, S.M., Seviour, R.J. y McDougall, B.M., 1997. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in beta-glucan degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 182-190.
- Pitt, J.I., 1979. The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press, 634.
- Pitt, J. I. y Hocking, A. D., 1997. Fungi and Food Spoilage. Ed. Pitt, J. I. and Hocking A. D. London Blackie Academic and Professional II.
- Plant, A.R., Oliver, J.E., Patchett, M.L., Daniel, R.M. y Morgan, H.W., 1988. Stability and Substrate-Specificity of A Beta-Glucosidase from the Thermophilic Bacterium Tp8 Cloned Into *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 262: 181-188.
- Pozzo, T., Pasten, J.L., Karlsson, E.N. y Logan, D.T., 2010. Structural and Functional Analyses of beta-Glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: A Thermostable Three-Domain Representative of Glycoside Hydrolase 3. *Journal of Molecular Biology*, 397: 724-739.
- Quiroz-Castañeda, R.E., Martínez-Anaya, C., Cuervo-Soto, L.I., Segovia, L. y Folch-Mallol, J.L., 2011. Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. *Microbial Cell Factories*, 10: 8-17.

- Ramani, G., Meera, B., Vanitha, C., Rao, M. y Gunasekaran, P., 2012. Production, Purification, and Characterization of a beta-Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. Applied biochemistry and biotechnology, 167: 959-972.
- Rao, C.S., 2001. Purification of large proteins using ion-exchange membranes. Process Biochemistry, 37: 247-256.
- Raper, K. B. y Thom, C. Manual of the *Penicillia*. 1949. Williams and Wilkins.
- Ravalason, H., Grisel, S., Chevret, D., Favel, A., Berrin, J.G., Sigoillot, J.C. y Herpoel-Gimbert, I., 2012. *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw. Bioresource Technology, 114: 589-596.
- Ravalason, H., Jan, G., Molle, D., Pasco, M., Coutinho, P.M., Lapierre, C., Pollet, B., Bertaud, F., Petit-Conil, M., Grisel, S., Sigoillot, J.C., Asther, M. y Herpoel-Gimbert, I., 2008. Secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium* strain CIRM-BRFM41 grown on softwood. Applied Microbiology and Biotechnology, 80: 719-733.
- Ribeiro, D.A., Cota, J., Alvarez, T.M., Bruechli, F., Bragato, J., Pereira, B.M., Pauletti, B.A., Jackson, G., Pimenta, M.T., Murakami, M.T., Camassola, M., Ruller, R., Dillon, A.J., Pradella, J.G., Paes Leme, A.F. y Squina, F.M., 2012. The *Penicillium echinulatum* Secretome on Sugar Cane Bagasse. Plos One, 7: e50571-e50580.
- Riedl, K.M., Zhang, Y.C., Schwartz, S.J. y Vodovotz, Y., 2005. Optimizing dough proofing conditions to enhance isoflavone aglycones in soy bread. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 8253-8258.
- Riou, C., Salmon, J.M., Vallier, M.J., Gunata, Z. y Barre, P., 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. Applied and Environmental Microbiology, 64: 3607-3614.
- Rogers, P., Jeon, Y., Lee, K. y Lawford, H., 2007. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. Biofuels Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology, 108: 263-288
- Rojas, A., Arola, L. y Romeu, A., 1995. Beta-Glucosidase Families Revealed by Computer-Analysis of Protein Sequences. Biochemistry and Molecular Biology International, 35: 1223-1231.



- Rojas-Escudero, E., Alarcon-Jimenez, A.L., Elizalde-Galvan, P. y Rojo-Callejas, F., 2004. Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 1027: 117-120.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Cherry, J.R., Harris, P. y Meyer, A.S., 2006. Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. *Biotechnology Progress*, 22: 493-498.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J.R. y Meyer, A.S., 2007. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. *Biotechnology Progress*, 23: 1270-1276.
- Roske, Y., Sunna, A., Pfeil, W. y Heinemann, U., 2004. High-resolution crystal structures of Caldiceflulosiruptor strain Rt8B.4 carbohydrate-binding module CBM27-1 and its complex with mannohexase. *Journal of Molecular Biology*, 340: 543-554.
- Royer, J.C. y Nakas, J.P., 1990. Interrelationship of Xylanase Induction and Cellulase Induction of *Trichoderma longibrachiatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2535-2539.
- Rye, C.S. y Withers, S.G., 2000. Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4: 573-580.
- Saha, B.C. y Bothast, R.J., 1996. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3165-3170.
- Saleh, A.A., Watanabe, S., Annaluru, N., Kodaki, T. y Makino, K., 2006. Construction of various mutants of xylose metabolizing enzymes for efficient conversion of biomass to ethanol. *Nucleic acids symposium series*, 2004: 279-280.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyyssonen, E., Bhatia, A., Ward, M. y Penttila, M., 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry*, 269: 4202-4211.
- Salvachúa, D., Prieto, A., Lopez-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, A.T. y Martínez, M.J., 2011. Fungal pretreatment: An alternative in

second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology*, 102: 7500-7506.

Salvachúa, D., Martínez, A.T., Tien, M., López-Lucendo, M.F., García, F., de los Ríos, V., Martínez, M.J. y Prieto, A., 2013. Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, 6: 115-129.

Sambrook, J. y Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Samson, R., Yilmaz, N., Houbaken, J., Spierenburg, H., Seifert, K., Peterson, S., Varga, J. y Frisvad, J., 2011. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in mycology*, 70: 159-183.

Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.*, 27: 185-194.

Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S. y Aikat, K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew. Energ.*, 37: 19-27.

Savitha, S., Sadhasivam, S. y Swaminathan, K., 2009. Modification of paper properties by the pretreatment of wastepaper pulp with *Graphium putredinis*, *Trichoderma harzianum* and fusant xylanases. *Bioresource Technology*, 100: 883-889.

Saykhedkar, S., Ray, A., Ayoubi-Canaan, P., Hartson, S.D., Prade, R. y Mort, A.J., 2012. A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. *Biotechnology for Biofuels*, 5: 52-69.

Schulein, M., 1997. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *Journal of Biotechnology*, 57: 71-81.

Schwarze, F.W.M.R., Engels, J. y Mattheck, C., 2000. *Fungal strategies of decay in trees*. Springer, Berlin.

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. y Peitsch, M.C., 2003. Swiss-Model: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.*, 31: 3381-3385.

- Sehnm, N.T., Ramos de Bittencourt, L., Camassola, M. y Dillon, A.J., 2006. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 163-167.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68: 850-858
- Shimonaka, A., Murashima, K., Koga, J., Baba, Y., Nishimura, T., Kubota, H. y Kono, T., 2006. Amino acid regions of family 45 endoglucanases involved in cotton defibrillation and in resistance to anionic surfactants and oxidizing agents. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70: 2460-2466.
- Shoseyov, O., Shani, Z. y Levy, I., 2006. Carbohydrate binding modules: Biochemical properties and novel applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 283-290.
- Singh, R., Varma, A., Laxman, R. y Rao, M., 2009. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with commercial cellulase. *Bioresource Technology*, 100: 6679-6681.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C. y Pandey, A., 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 541-549.
- Singhvi, M., Adsul, M. y Gokhale, D., V., 2011. Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. *Bioresource Technology*, 102: 6569-6572.
- Skomarovsky, A.A., Gusakov, A.V., Okunev, O.N., Solov'eva, I.V., Bubnova, T.V., Kondrat'eva, E.G. y Sinitsyn, A.P., 2005. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparations of *Penicillium* and *Trichoderma* fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41: 182-184.
- Skomarovsky, A.A., Markov, A.V., Gusakov, A.V., Kondrat'eva, E.G., Okunev, O.N., Bekkerevich, A.O., Matys, V.I. y Sinitsyn, A.P., 2006. New cellulases efficiently hydrolyzing lignocellulose pulp. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 42: 674-680.

- Solov'eva, I.V., Okunev, O.N., Vel'kov, V.V., Koshelev, A.V., Bubnova, T.V., Kondrat'eva, E.G., Skomarovskii, A.A. y Sinitsyn, A.P., 2005. The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases. *Microbiology*, 74: 141-146.
- Somogyi, M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160: 61-73.
- Sorensen, A., Ahring, B.K., Luebeck, M., Ubhayasekera, W., Bruno, K.S., Culley, D.E. y Luebeck, P.S., 2012. Identifying and characterizing the most significant beta-glucosidase of the novel species *Aspergillus saccharolyticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 58: 1035-1046.
- Sousa, L.D., Chundawat, S.P.S., Balan, V. y Dale, B.E., 2009. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 20: 339-347.
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Restuccia, C. y Giudici, P., 2002. Properties of endogenous beta-glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 1030-1035.
- Srisodsuk, M., Reinikainen, T., Penttila, M. y Teeri, T.T., 1993. Role of the Interdomain Linker Peptide of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase-I in Its Interaction with Crystalline Cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 20756-20761.
- Steentoft, C., Vakhrushev, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B., Schjoldager, K.T.B., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N.B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Bennett, E.P., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H.H., Lavery, S.B. y Clausen, H., 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *Embo Journal*, 32: 1478-1488.
- Stothard, P., 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28: 1102-1111.
- Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R. y Pandey, A., 2005. Microbial cellulases - Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64: 832-844.
- Sun, X., Liu, Z., Zheng, K., Song, X. y Qu, Y., 2008. The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under

induction or repression conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 560-567.

Sun, Y. y Cheng, J.Y., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.*, 83: 1-11.

Suzuki, K., Sumitani, J.I., Nam, Y.W., Nishimaki, T., Tani, S., Wakagi, T., Kawaguchi, T. y Fushinobu, S., 2013. Crystal structures of glycoside hydrolase family 3 beta-glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*. *Biochemical Journal*, 452: 211-221.

Tabka, M., Herpoel-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M. y Sigoillot, J., 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 897-902.

Tabuchi, A., Li, L.C. y Cosgrove, D.J., 2011. Matrix solubilization and cell wall weakening by beta-expansin (group-1 allergen) from maize pollen. *Plant Journal*, 68: 546-559.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731-2739.

Teeri, T.T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C. y Jones, T.A., 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? *Biochemical Society Transactions*, 26: 173-178.

Teunissen, M.J., Baerends, R.J.S., Knelissen, R.A.G., Dencamp, H.J.M.O. y Vogels, G.D., 1992. A Semicontinuous Culture System for Production of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes by the Anaerobic Fungus *Piromyces* Sp Strain E2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38: 28-33.

Texier, H., Dumon, C., Neugnot-Roux, V., Maestracci, M. y O'Donohue, M.J., 2012. Redefining XynA from *Penicillium funiculosum* IMI 378536 as a GH7 cellobiohydrolase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39: 1569-1576.

Tomme, P., Warren, R.A. y Gilkes, N.R., 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in microbial physiology*, 37: 1-81.

Tran, V., Hoffmann, L., Rabiller, C., Tellier, C. y Dion, M., 2010. Rational design of a GH1 beta-glycosidase to prevent self-condensation

during the transglycosylation reaction. *Protein Engineering Design & Selection*, 23: 43-49.

- Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annual Review of Biochemistry*, 6: 24-30.
- Tsitsimpikou, C., Christakopoulos, P., Makropoulou, M., Kekos, D., Macris, B.J. y Kolisis, F.N., 1997. Role of methanol on the catalytic behavior of beta-glucosidase from *Fusarium oxysporum*. *Biotechnology Letters*, 19: 31-33.
- Turner, P., Mamo, G. y Karlsson, E.N., 2007a. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Fact.*, 6: 9-32.
- Turner, P., Svensson, D., Adlercreutz, P. y Karlsson, E.N., 2007b. A novel variant of *Thermotoga neapolitana* beta-glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucosides by transglycosylation. *Journal of Biotechnology*, 130: 67-74.
- van Dyk, J. y Pletschke, B., I, 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30: 1458-1480.
- van Rantwijk, F., Oosterom, M.W.V. y Sheldon, R.A., 1999. Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 6: 511-532.
- van Wyk, J.P.H., 1998. Paper hydrolysis by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 63: 275-277.
- Varghese, J.N., Hrmova, M. y Fincher, G.B., 1999. Three-dimensional structure of a barley beta-D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. *Structure with Folding & Design*, 7: 179-190.
- Venturi, L.L., Polizeli, M.D., Terenzi, H.F., Furriel, R.D. y Jorge, J.A., 2002. Extracellular beta-D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties. *Journal of Basic Microbiology*, 42: 55-66.
- Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanpera, J. y Siika-aho, M., 2007. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 108: 121-145.



- Visser, E.M., Falkoski, D.L., de Almeida, M.N., Maitan-Alfenas, G.P. y Guimaraes, V.M., 2013. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 144: 587-594.
- Wada, M., Ike, M. y Tokuyasu, K., 2010. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. *Polymer Degradation and Stability*, 95: 543-548.
- Wang, T.S.A., Lupoli, T.J., Sumida, Y., Tsukamoto, H., Wu, Y., Rebets, Y., Kahne, D.E. y Walker, S., 2011. Primer Preactivation of Peptidoglycan Polymerases. *Journal of the American Chemical Society*, 133: 8528-8530.
- Watanabe, H. and Tokuda, G., 2010. Cellulolytic Systems in Insects. *Annual Review of Entomology*, 55: 609-632.
- Watanabe, S., Abu Saleh, A., Pack, S.P., Annaluru, N., Kodaki, T. y Makino, K., 2007. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiology-Sgm*, 153: 3044-3054.
- Watanabe, T., Sato, T., Yoshioka, S., Koshijima, T. y Kuwahara, M., 1992. Purification and Properties of *Aspergillus niger* beta-glucosidase. *European Journal of Biochemistry*, 209: 651-659.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. (Academic Press, I.N.Y. ed.), 315-322
- Whitney, S.E.C., Gidley, M.J. y McQueen-Mason, S.J., 2000. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *Plant Journal*, 22: 327-334.
- Willner, I., Basnar, B. y Willner, B., 2007. From molecular machines to microscale motility of objects: Application as "smart materials", sensors, and nanodevices. *Advanced Functional Materials*, 17: 702-717.
- Wilson, D. y Irwin, D., 1999. Genetics and Properties of Cellulases. *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. Springer Berlin Heidelberg, 65: 1-21.

- Wingren, A., Galbe, M., Roslander, C., Rudolf, A. y Zacchi, G., 2005. Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a simultaneous saccharification and fermentation based bioethanol process. Technical and economic evaluation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 121: 485-499.
- Withers, S.G., 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, 44: 325-337.
- Wolfenden, R., Lu, X.D. y Young, G., 1998. Spontaneous hydrolysis of glycosides. *Journal of the American Chemical Society*, 120: 6814-6815.
- Wood, T.M. y McCrae, S.I., 1972. Purification and Properties of C1 Component of *Trichoderma koningii* Cellulase. *Biochemical Journal*, 128: 1183-1192.
- Workman, W.E. y Day, D.F., 1982. Purification and Properties of Beta-Glucosidase from *Aspergillus terreus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 1289-1295.
- Wortman, J.R., Gilsenan, J.M., Joardar, V., Deegan, J., Clutterbuck, J., Andersen, M.R., Archer, D., Bencina, M., Braus, G., Coutinho, P., von Doehren, H., Doonan, J., Driessen, A.J., Durek, P., Espeso, E., Fekete, E., Flipphi, M., Garcia Estrada, C., Geysens, S., Goldman, G., de Groot, P.W., Hansen, K., Harris, S.D., Heinekamp, T., Helmstaedt, K., Henrissat, B., Hofmann, G., Homan, T., Horio, T., Horiuchi, H., James, S., Jones, M., Karaffa, L., Karanyi, Z., Kato, M., Keller, N., Kelly, D.E., Kiel, J.A., Kim, J.M., van der Klei, I.J., Klis, F.M., Kovalchuk, A., Krasevec, N., Kubicek, C.P., Liu, B., MacCabe, A., Meyer, V., Mirabito, P., Miskei, M., Mos, M., Mullins, J., Nelson, D.R., Nielsen, J., Oakley, B.R., Osmani, S.A., Pakula, T., Paszewski, A., Paulsen, I., Pilsyk, S., Poci, I., Punt, P.J., Ram, A.F., Ren, Q., Robellet, X., Robson, G., Seiboth, B., van Solingen, P., Specht, T., Sun, J., Taheri-Talesh, N., Takeshita, N., Ussery, D., Vankuyk, P.A., Visser, H., de Vondervoort, P.J.I., de Vries, R.P., Walton, J., Xiang, X., Xiong, Y., Zeng, A.P., Brandt, B.W., Cornell, M.J., van den Hondel, C.A., Visser, J., Oliver, S.G. y Turner, G., 2009. The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: A community effort. *Fungal Genetics and Biology*, 46: S2-S13.
- Xiao, Z.Z., Zhang, X., Gregg, D.J. y Saddler, J.N., 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied biochemistry and biotechnology*, 113: 1115-1126.



- Yan, T.R. y Liao, J.C., 1998. Synthesis of cello-oligosaccharides from cellobiose with beta-glucosidase II from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 20: 591-594.
- Yan, T.R., Lin, Y.H. y Lin, C.L., 1998. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase II with high hydrolysis and transglucosylation activities from *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 431-437.
- Yang, H.W., Viera, C., Fischer, J. y Etzel, M.R., 2002. Purification of a large protein using ion-exchange membranes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41: 1597-1602.
- Yang, S., Jiang, Z., Yan, Q. y Zhu, H., 2008. Characterization of a thermostable extracellular beta-glucosidase with activities of exoglucanase and transglycosylation from *Paecilomyces thermophila*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 602-608.
- Yazaki, T., Ohnishi, M., Rokushika, S. y Okada, G., 1997. Subsite structure of the beta-glucosidase from *Aspergillus niger*, evaluated by steady-state kinetics with cello-oligosaccharides as substrates. *Carbohydrate Research*, 298: 51-57.
- Yelle, D.J., Ralph, J., Lu, F. y Hammel, K.E., 2008. Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. *Environ. Microbiol.*, 10: 1844-1849.
- Yeoman, C.J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C.M., Mackie, R.I. y Cann, I.K., 2010. Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry, 70: 1-55.
- Yikrazuul, 2009. Possible structure of xylan, <http://en.wikipedia.org/wiki/Xylan>.
- Yilmaz, N., Houbraken, J., Hoekstra, E., Frisvad, J., Visagie, C. y Samson, R., 2012. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. *Persoonia*, 29: 39-54.
- Yoon, J.H. y Ajisaka, K., 1996. The synthesis of galactopyranosyl derivatives with beta-galactosidases of different origins. *Carbohydrate Research*, 292: 153-163.

- Zaldívar, J., Nielsen, J. y Olsson, L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 17-34.
- Zhang, Y.H.P. y Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88: 797-824.
- Zhong, L., Matthews, J.F., Crowley, M.F., Rignall, T., Talon, C., Cleary, J.M., Walker, R.C., Chukkapalli, G., McCabe, C., Nimlos, M.R., Brooks, C.L., Himmel, M.E. y Brady, J.W., 2008. Interactions of the complete cellobiohydrolase I from *Trichodera reesei* with microcrystalline cellulose I beta. *Cellulose*, 15: 261-273.



**Portada:** Micrografía electrónica de barrido y colonias del hongo *Talaromyces amestokiae*.

